

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Yersinia enterocolitica biotyypin 1A ja *Y. enterocolitica*
kaltaisten bakteerikantojen geneettisen monimuotoisuuden ja
lämpökestoisten enterotoksiinigeenien kartoitus

Pro gradu tutkielma

Kaisa Jalkanen

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Jyväskylä 2007

| | |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tekijä: | Kaisa Jalkanen |
| Tutkielman nimi: | <i>Yersinia enterocolitica</i> biotyypin 1A ja <i>Y. enterocolitican</i> kaltaisten bakteerikantojen geneettisen monimuotoisuuden ja lämpökestoisten enterotoksiinigeenien kartoitus |
| English title: | Genetic heterogeneity and distribution of enterotoxin genes in <i>Yersinia enterocolitica</i> biotype 1A and <i>Y. enterocolitica</i> -like strains |
| Päivämäärä: | 9.8.2007 Sivumäärä: 61+2 |
| Laitos: | Bio- ja ympäristötieteiden laitos |
| Oppiaine: | Biotekniikka |
| Tutkielman ohjaaja: | tutkimusprofessori Anja Siitonen, FT |

Tiivistelmä:

Yersinia-lajeja tunnetaan 11, joista kolme on ihmisille patogeenisia. *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* aiheuttavat yersinioosina tunnetun suolistoinfektion ja *Y. pestis* tunnetaan ruton aiheuttajana. *Y. enterocolitica* voidaan jakaa useisiin alatyyppeihin O-antigeenin (serotyypin) ja biokemiallisen aktiivisuuden (biotyyppi) mukaan. Biotyyppin 1A kantoja, johon kuuluu useita eri serotyyppejä ja tyypittymättömiä kantoja, on perinteisesti pidetty ihmisille ei-patogeenisena. Ei-patogeenisena pidetyt *Yersinia*-lajit, joita kutsutaan *Y. enterocolitican* kaltaisiksi lajeiksi, ovat *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri* sekä *Y. ruckeri*.

Monet epidemiologiset ja kokeelliset tutkimukset antavat viitteitä ei-patogeenisina pidettyjen kantojen mahdollisesta virulenssista ja nykyään osan *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoista tiedetään aiheuttavan jonkin asteisen taudin ihmiselle. Biotyyppiin 1A liitettyjen infektioiden oireet eivät juuri eroa patogeenisten *Y. enterocolitica*-bakteerien aiheuttamista oireista, vaikka ne ovatkin yleensä lievemmat. Yleisimmät oireet ovat ripuli ja vatsakipu. Tutkimuksissa huomattava osa sairailta ihmisiltä eristetyistä yersiniakannoista kuuluu *Y. enterocolitican* biotyypin 1A tai ei-patogeenisiin serotyyppeihin. Myös *Y. enterocolitican* kaltaiset kannat on yhdistetty vatsaoireisiin ja niitä eristetään potilasnäytteistä.

Y. enterocolitica biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisilta kannoilta puuttuvat perinteiset virulenssigeenit tai ne ovat toimimattomia. Lämpökestoista enterotoksiinia koodittavia geenejä on kuitenkin löydetty osalta ei-patogeenisina pidetyistä kannoista, vaikka geenien läsnäolo bakteerin genomissa ei välttämättä korreloi toksiinin tuotannon kanssa. Toksiinigeenejä pidetään kuitenkin tärkeinä virulenssitekijöinä ja ne on liitetty infektioiden aiheuttamaan ripuliin.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli kartoittaa kotimaisten *Y. enterocolitica* biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen geneettistä monimuotoisuutta pulssikenttägelelektroforeesin (PFGE) avulla sekä tutkia lämpökestoisten enterotoksiinigeenien esiintyvyyttä kannoissa polymeraasiketjureaktion (PCR) ja DNA sekvensoinnin avulla. Saatuja tuloksia verrattiin lisäksi potilaiden oiretietoihin. Tutkimuksessa oli mukana ihmisistä ja elintarvikkeista eristettyjä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisia kantoja.

Tutkimuksissa paljastui *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen geneettinen heterogeenisuus. Muutamia lähes samanlaisten PFGE-profiilien muodostamia ryhmiä kuitenkin esiintyi. Lähes kaikilta tutkituilta *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilta löytyi enterotoksiinigeenihomologi kromosomista. Myös kahdelta *Y. bercovieri*-kannalta löytyi toksiinigeenihomologi. Toksiinigeenien nukleotidisekvenssit olivat etenkin varsinaisen toksiinin osalta hyvin samanlaiset DNA sekvensoinnin mukaan. Merkittäviä eroja *Y. enterocolitica* biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen aiheuttamien oireiden välillä ei ilmennyt. Mikään kysytyistä oireista ei korreloinut PFGE- tai toksiinigeenitulosten kanssa.

Author: Kaisa Jalkanen
Title of thesis: Genetic heterogeneity and distribution of enterotoxin genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and *Y. enterocolitica*-like strains
Finnish title: *Yersinia enterocolitica* biotyypin 1A ja *Y. enterocolitica* kaltaisten bakteerikantojen geneettisen monimuotoisuuden ja lämpökestoisten enterotoksiinigeenien kartoitus
Date: 9.8.2007 **Pages:** 61+2
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Biotechnology
Supervisor(s): Anja Siitonen, FT

Abstract:

The genus *Yersinia* is composed of 11 different species and three of them are considered pathogenic to humans. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* cause gastroenteritis called yersiniosis and *Y. pestis* is the bacterial agent of plague. *Y. enterocolitica* strains are classified on the basis of biochemical characteristics (biotype) and variability of the O-antigen (serotype). Of the six biotypes *Y. enterocolitica* 1A strains which encompass a wide range of serotypes and untypable strains are considered non-pathogenic to humans. Other *Yersinia* species which are *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri* and *Y. ruckeri* are called *Y. enterocolitica*-like species and also generally considered to be non-pathogenic.

There is considerable body of epidemiological and experimental evidence to indicate that at least some non-pathogenic strains are able to cause gastrointestinal symptoms which resemble those caused by pathogenic *Yersinia*. Symptoms caused by strains considered non-pathogenic are milder and generally limited to gastrointestinal tract with diarrhea and abdominal pain. *Y. enterocolitica* biotype 1A and *Y. enterocolitica*-like strains are frequently isolated from humans with gastrointestinal symptoms even though said to be non-pathogenic.

Non-pathogenic *Yersinia* strains do not possess the known virulence-associated determinants which are found in pathogenic *Yersinia* or these genes are inactive in *Y. enterocolitica* biotype 1A and *Y. enterocolitica*-like strains. Some non-pathogenic *Yersinia* strains carry a heat-stable enterotoxin gene but the presence of the gene does not correlate to the production of enterotoxin. Enterotoxin is considered to be an important virulence factor in many bacteria and it may contribute to the production of diarrhea.

The aim of this study was to investigate the genetic diversity of domestic *Y. enterocolitica* biotype 1A and *Y. enterocolitica*-like strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Some of the strains were also researched for the presence of heat-stable enterotoxin gene by PCR and some of the genes further studied by DNA sequencing. Results were compared to the symptoms of the patients. The strains of this study were domestic *Y. enterocolitica* biotype 1A and *Y. enterocolitica*-like strains isolated from humans and food samples.

Research revealed a high degree of genetic heterogeneity among *Y. enterocolitica* biotype 1A strains by PFGE. Some groups of almost identical PFGE profiles were discovered. Almost all *Y. enterocolitica* biotype 1A strains that were examined possessed the enterotoxin gene. There were also two *Y. bercovieri* strains that gave positive results for enterotoxin PCR. Mature toxin gene sequences were highly similar in all studied strains according to DNA sequencing results. Significant differences between the symptoms of *Y. enterocolitica* biotype 1A and *Y. enterocolitica*-like strains were not observed. None of the symptoms correlated with PFGE or enterotoxin gene PCR results.

Keywords: *Y. enterocolitica* biotype 1A, *Y. enterocolitica*-like strains, PFGE, enterotoxin

ALKUSANAT

Pro-gradu työni ohjaajana toimi tutkimusprofessori Anja Siitonen, FT, ja valvojana professori Christian Oker-Blom. Työ toteutettiin Kansanterveyslaitoksen (KTL:n) bakteeri- ja tulehdustautien osaston suolistobakteerilaboratoriossa, yhteistyössä KTL:n infektioepidemiologian osaston sekä TavastLabin (Hämeenlinnan seudun kansanterveystyön kuntayhtymän Ympäristö- ja elintarvikelaboratorio) kanssa. Kiitän ohjaajaani, valvojaani sekä yhteistyökumppaneitani asiantuntemuksen jakamisesta. Haluan esittää kiitokseni myös bakteeri- ja tulehdustautien osaston henkilökunnalle, etenkin suolistobakteerilaboratorion työntekijöille. Erityisesti haluan kiittää tutkija Leila Sihvosta, MMM, avusta työn kaikissa vaiheissa sekä dosentti Kaisa Haukkaa, MMT, ideoista ja kommentteista. Myös perheeni sekä avopuolisoni Jyri Ahonen ansaitsevat kiitokset kannustuksesta. Työn rahoituksesta vastasi Maa- ja metsätalousministeriö (4850/501/2004) sekä KTL.

SISÄLLYSLUETTELO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 JOHDANTO | 8 |
| 1.1 <i>Yersinia</i> -suku..... | 8 |
| 1.2 <i>Yersinia enterocolitica</i> | 8 |
| 1.2.1 Biotyypit..... | 8 |
| 1.2.2 Serotyypit | 9 |
| 1.3 <i>Y. enterocolitica</i> n kaltaiset lajit | 9 |
| 1.4 Yersinioiden ekologia | 10 |
| 1.5 <i>Y. enterocolitica</i> n virulenssitekijät | 11 |
| 1.5.1 Plasmidin koodittamia virulenssitekijöitä..... | 12 |
| 1.5.1.1 <i>yops</i> -geenit..... | 12 |
| 1.5.1.2 <i>yadA</i> -geeni..... | 13 |
| 1.5.2 Kromosomaalisia virulenssitekijöitä..... | 13 |
| 1.5.2.1 <i>inv</i> -geeni | 13 |
| 1.5.2.2 <i>ail</i> -geeni..... | 14 |
| 1.5.2.3 <i>myf</i> -geenialue | 14 |
| 1.5.2.4 <i>yst</i> -geenit..... | 14 |
| 1.6 Yersinioosin oireet..... | 18 |
| 1.6.1 Infektion kulku..... | 18 |
| 1.7 <i>Y. enterocolitica</i> biotyypin 1A kliininen merkitys | 19 |
| 1.8 <i>Y. enterocolitica</i> n kaltaisten lajien kliininen merkitys | 22 |
| 1.9 Yersinioiden esiintyminen Suomessa | 23 |
| 1.9.1 Esiintyminen ympäristössä..... | 23 |
| 1.9.2 Infektioiden esiintyvyys | 23 |
| 1.10 Laboratoriodiagnostiikka | 24 |
| 1.10.1 Yersinian osoittaminen viljelyllä kliinisistä näytteistä | 24 |
| 1.10.2 Yersinioiden lajimääritys ja fenotyypitys..... | 24 |
| 1.10.3 Pulssikenttägeelielektroforeesi (PFGE) Yersinioiden genotyypityksessä | 27 |
| 1.10.3.1 Menetelmän periaate | 27 |
| 1.10.3.2 Soveltuvuus Yersinioille..... | 27 |
| 1.10.4 Muita molekyylogeneettisiä tyyppitysmenetelmiä..... | 28 |
| 2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET | 30 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 3 AINEISTO JA MENETELMÄT | 31 |
| 3.1 Bakteerikannat..... | 31 |
| 3.2 PFGE..... | 33 |
| 3.2.1 DNA:n eristäminen | 33 |
| 3.2.2 DNA:n pilkkominen restriktioentsyymillä..... | 33 |
| 3.2.3 Geelielektroforeesi..... | 34 |
| 3.2.4 Geelien analysointi..... | 34 |
| 3.3 <i>yst</i> -geenien osoittaminen..... | 35 |
| 3.3.1 DNA:n eristäminen | 35 |
| 3.3.2 Monistus PCR:lla..... | 35 |
| 3.3.3 Agaroosigeelielektroforeesi..... | 36 |
| 3.4 <i>yst</i> -geenien sekvensointi | 36 |
| 3.5 Potilaskyselyt..... | 37 |
| 4 TULOKSET | 38 |
| 4.1 PFGE tulokset..... | 38 |
| 4.1.1 Restriktioentsyymien valinta..... | 38 |
| 4.1.2 <i>Y. enterocolitica</i> biotyypin 1A PFGE-tyypit..... | 38 |
| 4.1.3 <i>Y. enterocolitican</i> kaltaisten kantojen PFGE-tyypit..... | 40 |
| 4.2 <i>yst</i> -geenien esiintyminen yersinioissa..... | 41 |
| 4.2.1 <i>Y. enterocolitica</i> biotyyppi 1A..... | 41 |
| 4.2.2 <i>Y. enterocolitican</i> kaltaiset kannat..... | 41 |
| 4.3 <i>yst</i> -geenien nukleotidisekvenssit | 43 |
| 4.4 Potilaiden ikä- ja oirejakauma..... | 45 |
| 5 TULOSTEN TARKASTELO | 48 |
| 5.1 Kantojen monimuotoisuus | 48 |
| 5.2 <i>yst</i> -toksiinigeenin esiintyvyyden merkitys..... | 50 |
| 5.3 Toksiinigeenin rakenteen tarkastelu | 51 |
| 5.4 Tutkimuksen tulosten vertailu potilaiden oireisiin..... | 52 |
| 5.5 Jatkotutkimusehdotuksia..... | 53 |
| LÄHDELUETTELO | 55 |
| LIITE Kasvatusalustat ja reagenssit..... | 62 |

KÄYTETYT LYHENTEET

| | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <i>ail</i> | attachment and invasion locus |
| DNA | deoksiribonukleiinihappo |
| FE | Finland Enteric |
| <i>inv</i> | invasiini (engl. invasin) |
| <i>myf</i> | mucoid <i>Yersinia fibrillae</i> |
| PCR | polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction) |
| PFGE | pulssikenttägeelielektroforeesi (engl. pulsed-field gel electrophoresis) |
| pYV | plasmid of <i>Yersinia</i> Virulence |
| RHS | Reference Helsinki Salmonella |
| TBE | Tris-boraatti-elektroforeesipuskuri |
| TC | hyönteistoksiinia koodittavat geenit |
| TE | Tris-EDTA puskuri |
| YadA | <i>Yersinia</i> adhesin A |
| Yops | <i>Yersinia</i> outer membrane proteins |
| <i>yst</i> | <i>Yersinia</i> stabile toxin |

1 JOHDANTO

1.1 *Yersinia*-suku

Yersinia-suku kuuluu *Enterobacteriaceae*-heimoon. Yersiniat ovat gramnegatiivisia, psykrotrofisia, fakultatiivisesti anaerobeja sauvabakteereja, jotka eivät muodosta itiöitä. Ihmisille patogeenisina pidettyjä *Yersinia*-lajeja on kolme. *Yersinia pestis* tunnetaan pahamaineisen ruton aiheuttajana. *Y. pseudotuberculosis* ja *Y. enterocolitica* aiheuttavat suolistoinfektion, jota kutsutaan yersinioosiksi. *Y. enterocolitica*-laji voidaan jakaa useisiin alaryhmiin biokemiallisen aktiivisuuden (biotyypin) (Wauters ym.1987) ja lipopolysakkaridien O-antigeenin (serotyypin) mukaan. *Y. enterocolitica* biotyyppejä 1A, johon kuuluu useita eri serotyyppejä, on perinteisesti pidetty ei-patogeenisena. Ihmiselle ei-patogeenisina pidetyt *Yersinia*-lajit ovat *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri* ja *Y. ruckeri*, joka on tärkeä kalapatogeeni (ks. yleiskatsaus Sulakvelidze 2000).

1.2 *Yersinia enterocolitica*

1.2.1 Biotyypit

Y. enterocolitica-laji voidaan jakaa biokemiallisen aktiivisuuden mukaan kuuteen biotyypin; 1A, 1B, 2, 3, 4 ja 5 (Wauters ym. 1987) (Taulukko 1). Eri biotyypit korreloivat hyvin patogeenisuuden, serotyypin ja maantieteellisen esiintyvyyden mukaan (Taulukko 2). Ei-patogeenisena pidetty biotyyppi 1A on heterogeenisin biotyyppi ja se sisältää monia serotyyppejä sekä tyypittymättömiä kantoja. Muihin biotyyppeihin (1B–5) kuuluu ihmiselle patogeenisina pidettyjä serotyyppejä, kuten O:8 (biotyyppi 1B), O:9 ja O:5,27 (biotyyppi 2) sekä O:3 (biotyypit 3 ja 4).

Taulukko1: *Y. enterocolitica* biotyypien biokemialliset ominaisuudet*

| TESTI | BIOTYYPIN REAKTIO [†] | | | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|----|---|---|---|---|
| | 1A | 1B | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Lipaasiaktiivisuus (Tween-esteraasi) | + | + | - | - | - | - |
| Eskuliinin hydrolyysi (24h) | +/- | - | - | - | - | - |
| Salisiini (hapon tuotto 24h) | + | - | - | - | - | - |
| Ksyloosi (hapon tuotto) | + | + | + | + | - | v |
| Pyratsiiniamidaasiaktiivisuus | + | - | - | - | - | - |
| Indolin tuotto | + | + | v | - | - | - |
| Voges-Proskauer-testi | + | + | + | + | + | + |
| Trehaloosi (hapon tuotto) | + | + | + | + | + | - |
| Sorboosi (hapon tuotto) | + | + | + | + | + | - |
| Inositoli (hapon tuotto) | + | + | + | + | + | + |
| Nitraatin pelkistys | + | + | + | + | + | - |
| Ornitiinidekarboksylaasi | + | + | + | + | + | + |

*Wauters ym. 1987 ja Bottone 1997 mukaan

[†] +, positiivinen; -, negatiivinen; (+), hidas positiivinen; v, vaihteleva

1.2.2 Serotyypit

Y. enterocolitica serotyypitys perustuu bakteerin pinnalla olevan lipopolysakkaridin O-antigeenin rakenteen vaihteluihin. *Y. enterocolitica*-lajilla tunnetaan yli 60 eri serotyyppiä, joista 11 on yhdistetty patogeenisuuteen (Taulukko 2) (ks. yleiskatsaus Bottone 1997). Patogeenisiä serotyyppijä on kuitenkin löydetty myös muista *Yersinia*-lajeista (Aleksic, 1995). *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannat edustavat useita serotyyppijä, joista O:5, O:6,30, O:6,31, O:7,8 ja O:10 ovat yleisimpiä eristetyissä kannoissa (ks. yleiskatsaus Tennant ym., 2003). Lisäksi esiintyy paljon serotyypittymättömiä kantoja. Serotyypin O:3 ja O:9 kantoja on esiintynyt perinteisesti Euroopassa, Skandinaviassa ja Kanadassa, kun taas serotyypin O:8 ja O:5,27 kantoja Pohjois-Amerikassa. Nykyään serotyypin O:3 kannat ovat kuitenkin jopa yleisimmin esiintyviä yersiniabakteereja Yhdysvalloissa (Bisset ym., 1990, Bottone 1983).

1.3 *Y. enterocolitica* kaltaiset lajit

Y. intermedia, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri* sekä *Y. ruckeri* eivät nykyäsitksen mukaan yleensä aiheuta ihmiselle tautia. Koska ne muistuttavat ilmiänsultaan *Y. enterocoliticaa* ja osa niistä on erotettu *Y. enterocolitica* omiksi lajikseen 1980-luvun jälkeen, niitä kutsutaan *Y. enterocolitica*

kaltaisiksi lajeiksi. *Y. enterocolitican* kaltaisia lajeja on tutkittu huomattavasti vähemmän kuin patogeenisiä *Yersinia*-lajeja.

Taulukko2: *Y. enterocolitican* maantieteellinen ja ekologinen jakautuminen sero- ja biotyypin mukaan*

| Biotyyppi | Serotyyppi(t) | Maantieteellinen ja ekologinen jakautuminen |
|------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1A | O:5, O:6,30, O:6,31, O:7,8, O:18, O:46, tyypittymättömiä kantoja | Ympäristö, siat, elintarvikkeet, vesi, (oireettomien) eläinten ulosteet |
| 1B | O:8, O:4, O:13a, O:13b, O:20, O:21 | Ympäristö, siat (O:8) Yhdysvallat |
| 2 | O:9, O:5,27 | Siat, Eurooppa (O:9), Yhdysvallat (O:5,27), Japani (O:5,27) |
| 3 | O:1,2,3, O:5,27 | Siat (O:5,27) |
| 4 | O:3 | Siat, Eurooppa, Yhdysvallat |
| 5 | O:2,3 | Jänis |

* Mukailtu yleiskatsaus Bottone 1997

1.4 *Yersinioiden* ekologia

Yersinia-suvun bakteereita tavataan maa- ja vesiekosysteemeistä, eläimistä, elintarvikkeista ja vedestä lähes kaikkialta maailmasta. Esiintyminen vaihtelee eri lajien ja sero- sekä biotyypin mukaan (ks. yleiskatsaus Bottone, 1997). Tiettyjen patogeenisten *Y. enterocolitica*-serotyypin reservoaarina pidetään lähes yksin omaan sikaa ja sianlihatuotteiden ajatellaan toimivan bakteerin tartuntareitteinä ihmiseen (ks. yleiskatsaus Carniel ja Mollaret, 1990; Fredriksson-Ahomaa ym., 2001a). Oireettomista sioista eristettyjen serotyypin O:3 ja O:9 *Y. enterocolitica*-kantojen on tutkimusten mukaan todettu edustavan samoja biotyyppisiä kuin ihmisistä eristetyistä näytteistä löydettyjen kantojen (Kapperud ym., 1991). Myös koirista ja kissoista on eristetty patogeenisiä *Y. enterocolitica*-kantoja, mutta niiden yhteyttä ihmisten infektoihin ei ole todistettu (Fredriksson-Ahomaa ym., 2001b). *Y. enterocolitican* patogeenisten serotyypin aiheuttamat epidemiat on usein jäljitetty maitoon (serotyyppi O:8) ja maitotuotteisiin (bioserotyyppi 4/O:3) (Black ym., 1978; Abraham ym., 1997).

Y. enterocolitica biotyypin 1A kantoja esiintyy runsaasti luonnossa ja oireettomissa eläimissä. Näitä kantoja on eristetty maaperästä sekä erilaisista vesiympäristöistä kuten järivistä, kaivoista ja viemäreistä. Biotyyppin 1A kantoja on eristetty myös eläimistä, kuten linnuista, kaloista, erilaisista hyönteisistä, sammakoista ja lukuisista nisäkkäistä. Lisäksi kotieläimistä kuten lehmistä, sioista ja lampaista sekä elintarvikkeista, kuten vihanneksista, eri eläinten lihasta, kala- ja äyriäisruoista sekä maitotuotteista, on löydetty *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantoja. (ks. yleiskatsaus Tennant, 2003)

Y. enterocolitican kaltaisia kantoja on eristetty luonnonvesistä, jätevesistä ja jopa juomavedestä. Lisäksi niitä on löydetty lemmikki- ja kotieläimistä sekä luonnoneläimistä, kuten hiiristä ja myyristä. Myös linnuista, matelijoista ja kaloista on eristetty *Y. enterocolitican* kaltaisia lajeja. Elintarvikkeista maitoa ja vihanneksia sekä sianlihaa on epäilty *Y. enterocolitican* kaltaisten lajien reservoaariksi. (ks. yleiskatsaus Sulakvelideze, 2000)

1.5 *Y. enterocolitican* virulenssitekijät

Y. enterocolitica-kannat voidaan jakaa patogeenisuuden mukaan kolmeen ryhmään hiirillä tehtävän kokeen perusteella (murine infection model) (ks. yleiskatsaus Bottone, 1997). Hiirten infektiot muistuttavat läheisesti ihmisillä esiintyviä patogeenisten *Y. enterocolitica* serotyyppien aiheuttamia infektiota (Carter, 1975). Korkeapatogeeniset kannat (bioserotyyppi 1B/O:8) aiheuttavat ihmisille systeemisiä infektiota ja tappavat hiiriä pieninäkin pitoisuuksina. Matalapatogeeniset kannat (biotyypit 2–5, serotyypit O:2,3, O:3, O:5,27 ja O:9) aiheuttavat taudin, mutta eivät kykene tappamaan hiiriä. Biotyyppin 1A kannat (useita serotyyppejä) muodostavat kolmannen ryhmän, joka ei aiheuta tautia hiirille. Korkea- ja matalapatogeeniset sekä ei-patogeeniset ryhmät eroavat toisistaan myös geneettisesti (Howard ym., 2006).

Yersinioiden perinteisinä *in vitro* patogeenisuuden merkkeinä on pidetty muun muassa tiettyjä O-serotyyppejä, eskuliinin hydrolyysin ja salisiinin fermentaation puuttumista, kalsiumriippuvaista kasvua (Gemski ym., 1980), kongopunan sitomiskykyä (Prpic ym., 1983), pyratiiniamidaasiaktiivisuuden puuttumista (Kandolo ja Wauters, 1985), invaasiota HeLa-soluihin (Devenish ja Schiemann, 1981), ulkomembraanin proteiineja (Skurnik,

1985) ja seerumiresistenssiä (Pai ja DeStephano, 1982). Useimpia edellä mainittuja ominaisuuksia koodittavat geenit sijaitsevat pYV (plasmid of *Yersinia* Virulence) -virulenssiplasmidissa (Zink ym., 1980). Sekä korkea- että matalapatogeenisilla kannoilla on kyseinen plasmidi solussaan. Korkeapatogeenisilla kannoilla on kromosomissaan lisäksi virulenssigeenisaareske HPI (High-Pathogenicity Island), joka koodittaa genejä jotka liittyvät raudan sitomiseen isännän elimistöstä bakteerin käyttöön (Carniel ym., 1996). Patogeeniset yersiniat tarvitsevat virulenssiplasmidin lisäksi useita kromosomaalisia tekijöitä täyden virulenssin saavuttamiseksi (Miller ym., 1989).

1.5.1 Plasmidin koodittamia virulenssitekijöitä

Yhtenä tärkeimpänä yersiniakantojen patogeenisuuden merkinä on pidetty 64–75 kb suuruista virulenssiplasmidia pYV, joka bakteereilla on soluissaan. Plasmidi koodittaa useita lämpötilasäädelyjä proteiineja, jotka auttavat bakteeria sopeutumaan elimistön ympäristöä korkeampaan lämpötilaan, kolonisoimaan elimistöä ja infektion edetessä välttämään isännän immuunipuolustuksen mekanismeja. Näitä ovat esimerkiksi Yops- ja YadA-proteiinit. Ei-patogeenisina pidetyiltä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisilta kannoilta ei yleensä löydy kyseistä virulenssiplasmidia. (ks. yleiskatsaus Bottone, 1997)

1.5.1.1 yops-geenit

Virulenssiplasmidissa olevat yops-geenit koodittavat Yops-proteiineja (*Yersinia* outer membrane proteins), joita on ainakin 11 erilaista. Nimestään huolimatta Yops-proteiinit eritetään ulos bakteerisolusta. Useat Yops-proteiinit auttavat bakteeria vastustamaan isännän immuunipuolustuksen syöjäsolujen hyökkäyksiä. Esimerkiksi YopH on tyrosiinifosfataasi, joka defosforyloi syöjäsolujen proteiineja häiriten niiden signaalijärjestelmän reittejä ja näin ollen normaalia toimintaa. YopB taas estää syöjäsolujen sytokiinien eritystä. Sytokiineilla on tärkeä rooli immuunipuolustuksen säätelyssä. Virulenssiplasmidi koodittaa myös yops-geenien säätelyyn tarvittavia proteiineja sekä niiden koodittamien proteiinien erittämiseen tarvittavaa mekanismia (type III secretion system). Yops-proteiinien syntetisointi on lämpötila- ja kalsium-säädelyä ja niiden tuotanto on maksimissaan matalissa kalsiumionien pitoisuuksissa +37 °C:ssa. (ks. yleiskatsaus Cornelis ym., 1998)

1.5.1.2 *yadA*-geeni

Y. enterocolitica-bakteerien kiinnittyminen sekä suolta peittävään limaan että epiteelisolujen pinnalle tapahtuu virulenssiplasmassa olevan *yadA*-geenin koodittaman suuren pintaproteiini YadA:n (*Yersinia adhesin A*) avulla. YadA kiinnittyy isäntäsolun pinnalla oleviin proteiineihin, kuten kollageeniin, laminiiniin ja fibronektiiniin (Flugel ym., 1994). YadA:n syntetisointi bakteerisolun pinnalle muuttaa solun pinnan hydrofiilisestä hydrofobiseksi ja parantaa näin bakteerin kiinnittymistä epiteelisoluihin. YadA:n on tiedetty osallistuvan myös seerumiresistenssin syntyyn estämällä komplementin aktivoitumista (Balligand ym., 1985; Pilz ym., 1992) ja tutkimusten mukaan se saattaisi olla tärkein prosessiin vaikuttava tekijä (Biedzka-Sarek ym., 2005). YadA:ta syntetisoidaan optimaalisesti +37 °C:ssa ja sen tuotanto on estynyt +25 °C:ssa (ks yleiskatsaus Bottone, 1997).

1.5.2 Kromosomaalisia virulenssitekijöitä

1.5.2.1 *inv*-geeni

Aktiivinen *inv*-geeni *Y. enterocolitican* kromosomissa koodittaa ulkomembraaniproteiini invasiinia, joka edesauttaa bakteeria kiinnittymään ja tunkeutumaan M-soluihin. Invasiinin kiinnittymiskohtana isännän solun pinnalla toimii ainakin viisi erilaista β 1-integriini-reseptoria (Isberg ja Leong, 1990). M-solut ovat ainoita ohutsuolen soluja, joiden luminaalipinnalta löytyy β 1-integriinejä ja tämä selittää bakteerien spesifisyyden kyseistä solutyyppeä kohtaan. *Inv*-geenin avustama bakteerien invaasio aiheuttaa isännän solujen tukirangan uudelleenjärjestäytymistä ja solun tukirangalla näyttäisi olevan aktiivinen rooli invasioprosessissa (Young ym., 1992). Invasiinilla on todettu olevan merkitystä etenkin infektion alkuvaiheessa, ennen kuin virulenssiplasmidin koodittamia proteiineja aletaan tuottaa (Pepe ja Miller, 1993). Invasiinia tuotetaan maksimaalisesti alle +28 °C:ssa, mutta happamissa olosuhteissa myös +37 °C:ssa (Pepe ym., 1994). Invasiinin merkitystä bakteerien patogeenisuudelle pidetään merkittävänä. Tutkimuksissa normaalisti ei-invasiivinen *E. coli*-kanta on saatu invasoitumaan soluihin kehittämällä *inv*-positiivinen rekombinantti kanta (Young ym., 1990).

1.5.2.2 *ail*-geeni

Myös *ail*-geenin koodittama proteiini sijaitsee ulkomembraanissa ja auttaa bakteeria kiinnittymään isännän soluihin sekä tunkeutuman niihin (Miller ja Falcow, 1988). Proteiinia pidetään kuitenkin toissijaisena invaasiotekijänä. Ail-proteiini osallistuu seerumiresistenssin syntyyn virulenssiplasmidin koodittaman YadA-proteiinin lisäksi (Bliska ja Falkow, 1992; Biedzka-Sarek ym., 2005) ja *ail*-geenialue löytyy vain patogeenisilta yersiniakannoilta (Miller ym., 1989). *ail*-geenin transkriptio on tehokkaimmillaan +37 °C:ssa.

1.5.2.3 *myf*-geenialue

Jotkin *Y. enterocolitica*-kannat tuottavat Myf-proteiineja (mucoid *Yersinia* Fibrillae), joista muodostetaan polymeerisiä fibrilli-rakenteita bakteerisolun pinnalle. Myf muistuttaa rakenteeltaan enterotoksigeenisen *E. coli* (ETEC) kolonisaatiotekijä CS3-pilusta. Myf-proteiineja koodittavaan geenialueeseen kuuluu useita geenejä, joista *myfB* ja *myfC* koodittavat klassisia pilin asentamiseen tarvittavia systeemejä; periplasman kaperonia ja tunnelin muodostavaa membraaniproteiinia. *myfA*-geeni koodittaa 21 kDa kokoista rakenneyksikköproteiinia, josta fibrilli koostuu (Iriarte ym., 1993). *myf*-geenien transkriptio on lämpötila ja pH säädeltyä ja niitä tuotetaan vain +37 °C:ssa ja happamissa oloissa. Myf-fibrilli edesauttaa bakteerin kiinnittymistä suolen soluihin ja avustaa näin mahdollisen enterotoksiinin toimintaa (Iriarte ja Cornelis, 1995).

1.5.2.4 *yst*-geenit

Y. enterocolitica-kantojen on tutkimuksissa todettu tuottavan lämpökestoista enterotoksiinia (Pai ja Mors, 1978). Enterotoksiinit ovat monien bakteerien tärkeitä virulenssitekijöitä aiheuttaen infektiioihin liitetyn ripulin (ks. yleiskatsaus Nair ja Takeda, 1998). Enterotoksiinien aiheuttama ripuli rajoittuu ohutsuoleen, jossa bakteeri kolonisoi suolta peittävää limaa erittäin samalla toksiinia. Toksiinien reseptorit ovat epiteelisolujen pinnalla ja spesifinen tarttuminen niihin johtaa nesteiden erittymiseen suoleen häiritsemällä solun ioni- ja vesitasapainon säätelymekanismeja. Ensimmäiset lämpökestoiset enterotoksiinit löydettiin ETEC-kannoilta, mutta myös jotkin muut *E. coli*-kannat ja vibriot tuottavat kyseisiä proteiineja. Lämpökestoiset enterotoksiinit ovat nimensä mukaisesti lämpöä kestäviä, runsaasti kysteiinitähteitä sisältäviä peptidejä ja rakenteeltaan sekä

toiminnaltaan samankaltaisia eri bakteerilajeilla. *Y. enterocolitica* toksiinia koodittavat kromosomaaliset *yst*-geenit (*Yersinia stabile toxin*) (Delor ym., 1990). Niiden tuottamat proteiinit ovat aminohapposekvenssiltään, rakenteeltaan ja toiminnaltaan ETEC:n ST-toksiinin (heat-stabile enterotoxin) kaltaisia (Takao ym., 1985). *Y. enterocolitica*-kannoilla tunnetaan kolme eri lämpökestoista enterotoksiinia (Yst), YstA, YstB ja YstC (Okamoto ym., 1981; Yoshino ym., 1994; Yoshino ym., 1995) (Kuva 1). YstA-tyyppiä on löydetty pääasiassa *Y. enterocolitica* patogeenisilta serotyypeiltä ja YstB-toksiinia lähes yksinomaan ei-patogeenisilta, biotyypin 1A kuuluvilta *Y. enterocolitica* kannoilta. Tutkimusten mukaan jopa 80 %:lla *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoista on *ystB*-geeni kromosomissaan (ks. yleiskatsaus Tennant ym., 2003). *ystA*- ja *ystB*-geenit koodittavat 71 aminohapon pituista proteiinin esiastetta, joka koostuu kolmesta osasta: signaalipeptidistä, pro-domeenista ja varsinaisesta toksiinista. Polypeptidin N-terminaalissa on lämpökestoille toksineille tyypillinen 19 aminohapon pituinen signaalipeptidi. *E. coli*lla signaalipeptidin proteolyttinen katkaisu johtaa toksiinien siirtymiseen periplasmaan (Okamoto ym., 1981). Signaalipeptidin katkaisun jälkeen jäljelle jäävän pro-domeenin katkaisu vapauttaa varsinaisen toksinin, mutta katkaisupaikasta ja pro-domeenin tehtävästä ei ole täyttä selvyyttä. *ystB*-geenin koodittaman proteiinin esiasteen C-terminaalissa on 30 aminohapon pituinen aktiivinen domeeni eli varsinainen toksini (Ramamurthy ym., 1997) YstC, jota tavataan vain harvoin, on suurin tunnetuista lämpökestoista toksineista ja tutkimusten mukaan sen aktiivinen domeeni koostuu 53 aminohaposta, pro-domeenin ollessa osa varsinaista toksinia (Huang ym., 1997). Varsinaisen toksinin aminohapposekvenssi on erittäin konservoitunut eri yersiniatoksiinien välillä (Kuva 2). C-terminaalissa 13 konservoitunutta aminohappoa sisältävät kuusi kysteiniiniähdettä, jotka muodostavat kolme molekyylin toksisuudelle sekä stabiiliudelle välttämätöntä rikkisidosta (Shimonishi ym., 1987). Toksiinigeenihomologeja on löydetty myös *Y. enterocolitica* kaltaisilta kannoilta, kuten *Y. kristensenii*ltä (Ykst) (Ibrahim ym., 1997) ja *Y. intermedia*lta (Kwaga ym., 1992).

| | | | |
|-------|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| | 1 | | 20 |
| YstA: | A T G A A A A A | G A T A G T T T T T | T G T T C T T G T G |
| YstB: | A T G A A A A A | G A T A A T T T T T | G G C T C T G G T A |
| YstC: | A T G A A A A A | A A T C G T T T T T | T G T T C T G A C G |
| Ykst: | A T G A A A A A | G A T A G T T T T T | T G T T C T T G T G |
| | | 40 | |
| YstA: | T T A A T G C T G T | C T T C A T T T | T G G A G C A T T C |
| YstB: | T T A A T G C T G T | T T T C A T T T | T T G T A C A T T A |
| YstC: | T T A A T G C T G T | T T T C A T T T | C G G A A C G T T A |
| Ykst: | T T A A T G C T G T | C T T C A T T T | T G G A A C A T T C |
| | 60 | | 80 |
| YstA: | G G C C A A G A A A C A | G T T T C A G G G C A G T T C | |
| YstB: | G G C C A A G A G A C G | G C T T C A A T G C A T C T T | |
| YstC: | G G T C A G G A G A C G | G C T T C A G G G C A G G T T | |
| Ykst: | G G C C A A G A G A C A | G C T T C G A G G C A G T T T | |
| | | 100 | |
| YstA: | A G T G A T G C A T T A | T C G A C A C C A A T A A C C | |
| YstB: | G A T G A T A C A T T A | T C G G C A C C A A T A G C C | |
| YstC: | G G T G A T G T A T C A | T C G T C A A C A A T A G C T | |
| Ykst: | G G T G A T G C A T T C | T C G A C A C C T A T C G C | |
| | 120 | → | |
| YstA: | G C T G A G G T A T A C A A G | C A A G C T T G T G A T | |
| YstB: | G C T G A G A T A A A C A G A | A A A G C G T G C G A T | |
| YstC: | A C T G A G G T A A G T G A G | G C T G A G T G C G G T | |
| Ykst: | G C T G A G G T A A A C A A A | A A A G C T T G C G A T | |
| | 140 | | 160 |
| YstA: | C C T C C G T C G C C A C C A G C | C G A A G T C A G T | |
| YstB: | A C T C A G A C C C C A T C G C C | T T C A G A A G A A | |
| YstC: | A C T C A G T C A G C A A C A A C | C C A A G G C G A A | |
| Ykst: | A C T G A A T T G C C G - C - - C | C T - - - C - - - | |
| | | 180 | |
| YstA: | A G T G A T T G G G A T - - - T G C | T G T G A T G T A | |
| YstB: | A A T G A T - - - G A T T G G T G T | T G T G A G G T A | |
| YstC: | A A T G A T T G G G A T T G G T G C | T G T G A G T T A | |
| Ykst: | - - T - - - - - G A T T G G T G C | T G T G A G G T A | |
| | 200 | | |
| YstA: | T G T T G C A A T C C C G C G | T G T G C T G G C T G C | |
| YstB: | T G T T G C A A T C C T G C C | T G T G C G G G T T G C | |
| YstC: | T G T T G C A A T C C T G C T | T G T T T G G T T G C | |
| Ykst: | T G C T G C A A T C C C G C G | T G T G C T G G C T G C | |
| YstA: | T A G | | |
| YstB: | T A G | | |
| YstC: | T A A | | |
| Ykst: | T A G | | |

Kuva 1: Yersinioiden lämpöstabiliien enterotoksiinigeenien nukleotidisekvenssien vertailu. Tummennetut alueet samanlaisia. Varsinaisen toksiinin sekvenssin alku merkitty nuolella. -: puuttuva emäs. ystA (U09235), ystB (D88145), ystC (D63578) ja ykst (X69218) -sekvenssit GenBank genomiteitokannasta. Mukailtu: Ramamurthy ym. 1997.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| YstA: | M | K | K | I | V | F | V | L | V | L | M | L | S | S | F | G | A | F | G | Q | E | T | V | S | G | Q |
| YstB: | M | K | K | I | I | L | A | L | V | L | M | L | F | S | F | C | T | L | G | Q | E | T | A | S | M | H |
| YstC: | M | K | K | I | V | F | V | L | T | L | M | L | F | S | F | G | T | L | G | Q | E | T | A | S | G | Q |
| Ykst: | M | K | K | I | V | F | V | L | V | L | M | L | S | S | F | G | T | F | G | Q | E | T | A | S | R | Q |
| → | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| YstA: | F | S | D | A | L | S | T | P | I | T | A | E | V | Y | K | Q | A | C | D | P | P | S | P | P | A | E |
| YstB: | L | D | D | T | L | S | A | P | I | A | A | E | I | N | R | K | A | C | D | T | Q | T | P | S | P | S |
| YstC: | V | G | D | V | S | S | T | I | A | T | E | V | S | E | A | E | C | G | T | Q | S | A | T | T | Q | |
| Ykst: | F | G | D | A | F | S | T | P | I | A | A | E | V | N | K | K | A | C | D | T | E | L | P | - | P | S |
| YstA: | V | S | S | D | W | D | - | C | C | D | V | C | C | N | P | A | C | A | G | C | | | | | | |
| YstB: | E | E | N | D | - | D | W | C | C | E | V | C | C | N | P | A | C | A | G | C | | | | | | |
| YstC: | G | E | N | D | W | D | W | C | C | E | L | C | C | N | P | A | C | F | G | C | | | | | | |
| Ykst: | - | - | - | - | - | D | W | C | C | E | V | C | C | N | P | A | C | A | G | C | | | | | | |

Kuva 2: Yersinia prekursori-toksiiniproteiinien aminohapposekvenssin vertailu. Tummennetut alueet samanlaisia. Varsinaisen toksinin alku on merkitty nuolella ja rikkisidokset muodostavat kysteinitähteet vahvennettu. -puuttuva aminohappo. Mukailtu: Ramamurthy ym. 1997.

Y. enterocolitica yst-geenin ilmentäminen on monimutkainen prosessi. Monet ympäristön fysikaaliset ja kemialliset tekijät sekä kasvuvaihe vaikuttavat selvästi yst-geenin transkriptioon. Toksiinigeenin transkriptio tapahtuu vahvimmissaan stationaarisessa kasvuvaiheessa (Mikulskis ym., 1994). Tutkimuksissa normaalilla kasvatusalustalla *Y. enterocolitica* viljelmät tuottivat havaittavia määriä toksinia vain alle +30 °C lämpötiloissa (Pai ja Mors, 1978; Kapperud, 1982), jonka ajateltiin vähentävän toksinin merkitystä virulenssitekijänä (ks. yleiskatsaus Bottone, 1997). Kuitenkin Mikulskis ym. (1994) havaitsivat YstA-toksiinituotantoa +37 °C:ssa kun kasvatusalustan pH:ta ja osmolaarisuutta muutettiin vastaamaan olosuhteita ihmisen suolistossa. Näissäkin olosuhteissa lämpötilan nousu vaikutti kuitenkin negatiivisesti yst-geenin transkriptioon. Tiedetään, että patogeeniset *Y. enterocolitica* kannat voivat menettää ominaisuuden tuottaa YstA:ta kromosomaalisen *ymoA* (*Yersinia* modulator) -säätelygeenin vaikutuksesta (Cornelis ym., 1991). *ymoA* osallistuu yst-geenin lämpötilasta johtuvaan repressioon ja kasvuvaihesäätelyyn sekä geenin hiljentämiseen. Vaikka *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilta tavataan ystB-geeniä, sen löytyminen ei välttämättä kuitenkaan korreloi kannan toksiinituotannon kanssa (Ramamurthy ym., 1997; Grant ym., 1998) ja voi olla että geeni on inaktiivinen joillain kannoilla. Singh ja Virdi (2004) havaitsivat kuitenkin toksiinituotantoa myös *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilla +37 °C:ssa suolen olosuhteita vastaavassa kasvatusmediassa. Myös *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen

tiedetään kantavan *ymoA*-säätelygeeniä (Grant ym., 1998) mikä voisi selittää myös *ystB*-geenin hiljentämisen (ks. yleiskatsaus Tennant ym., 2003). *yst*-geenien säätelyyn tarvitaan myös muita tekijöitä ja transkription voimakkuus riippuu vallitsevien ympäristötekijöiden lisäksi myös bakteerikannasta (Mikulskis ym., 1994).

1.6 Yersinioosin oireet

Y. enterocolitica aiheuttaa äkillisen ohutsuolen tulehduksen, johon liittyy kuumetta, oksentelua ja varsinkin lapsilla jopa veristä ripulia. Lapset ovat yleisin ikäryhmä, joilla patogeenisten *Y. enterocolitica* serotyyppeiden aiheuttamia infektiota esiintyy (Caprioli ym., 1978; Cimolai ym., 1994; Huovinen ym., 2006). Nuorilla aikuisilla bakteeri aiheuttaa myös akuuttia sykkyräsuolentulehdusta ja suoliliepeen imurauhastulehdusta, joka ilmenee umpisuolen tulehdusta muistuttavana vatsakipuna ja saattaa johtaa tarpeettomaan umpilisäkkeen poistoon. Myös verenmyrkytys on mahdollinen varsinkin potilailla, joilla on heikentynyt vastustuskyky tai jokin perussairaus. Jälkitauteina esiintyy erilaisia immunologisia komplikaatioita, kuten reaktiivista niveltulehdusta ja kyhmyruusua. Reaktiivista niveltulehdusta esiintyy useammin ihmisillä, joiden kudasantigeenityyppi on HLA-B27 (Dequeker ym., 1980). *Y. enterocolitican* aiheuttamat oireet ja niiden vakavuus vaihtelevat isännän iän lisäksi myös isännän perusterveydentilan sekä infektion aiheuttavan bakteerin serotyypin mukaan. (ks. yleiskatsaus Bottone, 1997)

1.6.1 Infektion kulku

Y. enterocolitica pääsee ruoansulatuskanavaan yleensä ruoan tai veden välityksellä. Yersiniabakteerien henkilöstä toiseen tapahtuvan leviämisen katsotaan olevan epätodennäköistä tarvittavan infektiivisen annoksen suuruuden, jonka on arveltu olevan 10^9 bakteeria/ml, vuoksi (Edelman ja Levine, 1980). Elimistöön päästyään bakteeri kulkeutuu ohutsuolen loppuosaan tai paksusuoleen, missä se aiheuttaa yersinioosiin liittyvät kliiniset oireet. Kolonisaatio alkaa bakteerien kiinnittymisellä suolta suojaavaan limakerrokseen, jossa ne myös lisääntyvät tehokkaasti. Bakteerit tunkeutuvat liman läpi ja kiinnittyvät solujen epiteelipinnalle. *Y. enterocolitica* etsiytyy suolessa Peyerin laikkujen eli ohutsuolen imusolmukkeiden yläpuolisten M-solujen pinnalle. M-solut ovat fagosytoivia suolen epiteelisoluja, joiden ensisijaisena tehtävänä on antigeenien esittely

immuunipuolustuksen soluille. Mikrobit käyttävät M-solujen fagosytoosia invasioreitteinä alla olevaan kudokseen. Bakteerit kolonisoivat Peyerin laikkuja tehokkaasti ja jakautuvat imukudoksessa. Imusuoniston välityksellä bakteerit leviävät läheisiin imusolmukkeisiin. Bakteerit voivat levitä myös sisäelimiin, kuten maksaan ja pernaan. (ks. yleiskatsaus Bottone, 1997).

1.7 *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kliininen merkitys

Perinteisesti ei-patogeenisena on pidetty niitä yersiniakantoja, joilla ei ole pYV-virulenssiplasmidia soluissaan. Myös tunnettujen kromosomaalisten virulenssimarkkereiden puuttumista tai toimimattomuutta kehon lämpötiloissa on pidetty ei-patogeenisuuden todisteena. Lisäksi tällaisten kantojen laaja esiintyminen luonnossa ja oireettomissa eläimissä on puhunut ei-patogeenisuuden puolesta. *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantoja on pidetty ihmisille harmittomina edellä mainituista syistä. Kuitenkin monet epidemiologiset ja kokeelliset tutkimukset antavat viitteitä niiden mahdollisesta virulenssista (ks. yleiskatsaus Tennant ym., 2003).

Nykyään osan *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoista tiedetään aiheuttavan jonkin asteisen taudin ihmiselle. Biotyyppiin 1A liitettyjen infektioiden oireet eivät juuri eroa virulenssiplasmidia kantavien bakteerien aiheuttamista oireista, vaikka ne ovatkin yleensä lievemmat ja rajoittuvat ruoansulatuselimistöön. Yleisimmin esiintyvät oireet ovat ripuli ja vatsakipu. Verenmyrkytystä esiintyy erittäin harvoin (ks. yleiskatsaus Tennant ym., 2003). Biotyyppin 1A infektiot ovat yleisiä kaikissa ikäryhmissä ja erityisesti niitä esiintyy vanhuksilla ja ihmisillä, jotka ovat yleisesti alttiita infektioille (Cimolai ym., 1994). Infektiot voivat kestää viikoista jopa kuukausiin ja esiintyä akuuttien infektioiden ja taantumajaksojen syklisinä vaihteluina (Ratnam ym., 1982). Biotyyppiin 1A on havaittu tutkimuksissa aiheuttaneen epidemioita (Greenwood ja Hooper, 1990; Ratnam ym., 1982). Akuuttien infektioiden lisäksi *Y. enterocolitica* biotyyppi 1A on yhdistetty myös jälkitauteihin (Ebringer ym., 1982).

Epidemiologisissa tutkimuksissa on saatu ristiriitaista tietoa *Y. enterocolitica* biotyypin 1A patogeenisuudesta. Eräissä tutkimuksissa huomattava osa sairailta ihmisiltä eristetyistä kliinisistä yersiniakannoista on kuulunut *Y. enterocolitican* biotyypin 1A tai ei-

patogeenisiin serotyyppeihin, ja ne eivät ole ilmentäneet tyypillisiä patogeenisuuden merkkeinä pidettyjä ominaisuuksia (Burnens ym., 1996; Bisset ym., 1990; Noble ym., 1987). Chilessä tehdyssä tapaus-verrokkitutkimuksessa *Y. enterocolitica* biotyyppi 1A liitettiin lasten ripulin oireisiin, mutta myös oireettomilta lapsilta eristettiin patogeenisia *Y. enterocolitica*-serotyyppejä sekä biotyypin 1A kantoja (Morris ym., 1991). Belgiassa tehdyssä tutkimuksessa ei sen sijaan löydetty yhteyttä biotyypin 1A ja vatsaoireiden esiintyvyyden välillä (van Noyen ym., 1980).

Y. enterocolitica biotyypin 1A kannoilla ei ole pYV-virulenssiplasmidia solussaan. Niiltä puuttuvat myös monet kromosomaaliset virulenssitekijät tai ne ovat inaktivoituneita. Invasiinia koodittava *inv*-geeni löytyy yleensä kaikilta *Y. enterocolitica* kannoilta, mutta sen on havaittu olevan inaktiivinen ei-patogeenisilla kannoilla (Pierson ja Falkow, 1990). Joiltain *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilta löytyy myös *ail*- ja/tai *myfA* -geenit, mutta niiden läsnäolon ei ole havaittu vaikuttavan kantojen adhesioon, invasioon tai potilaiden oireisiin ja siten niiden ajatellaan olevan inaktiivisia (Grant ym., 1998; Falcao ym., 2006). Virulenssiin liitetyt toimivat tekijät jotka virulenssiplasmidittomilta kannoilta löytyvät, ovat solun pinnan lipopolysakkaridin O-antigeeni, joka vaikuttaa muun muassa seerumiresistenssiin (Wachter ja Brade, 1989), superoksidi dismutaasi (SodA), joka auttaa bakteeria selviämään kudoksessa (Roggenkamp ym., 1997), sekä ureaasi, joka suojaaa bakteeria vatsahappoja vastaan (de Koning-Ward ja Robins-Browne, 1995). Myös toksiinigeeni *yst* löytyy usein ei-patogeenisilta kannoilta, vaikka enterotoksiiniaktiivisuutta havaitaan vain osalla kannoista (Grant ym., 1998). Solukokeissa on huomattu, että *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannat tunkeutuvat soluihin vaikkakin huomattavasti heikommin kuin kannat, joilla on virulenssiplasmidi (Schiemann ja Davenish, 1982). Sairailta ihmisiltä eristettyjen biotyypin 1A kantojen on tutkimuksissa todettu invasoivan Hep-2 (human pharygeal epithelial cells) ja CHO (chinese hamster ovary cells) -soluja tehokkaammin kuin oireettomilta ihmisiltä eristettyjen samaa biotyyppiä olevien kantojen, sekä kolonisoivan hiiren ruoansulatuskanavaa pitempiä aikoja (Grant ym., 1998). Toisissa tutkimuksissa taas ei ole havaittu eroja eläimistä tai ihmisistä eristettyjen kantojen kyvyssä invasoitua Hep2 -soluihin (McNally ym., 2006). Biotyypin 1A kantojen invaasiomekanismi näyttäisi olevan erilainen verrattuna patogeenisiin kantoihin (ks. yleiskatsaus Tennant ym., 2003). Sairailta ihmisiltä eristettyjen *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen on tutkimuksissa havaittu elävän ja jakaantuvan makrofagien sisällä pitempiä aikoja kuin oireettomilta ihmisiltä eristettyjen biotyypin 1A kantojen sekä pystyvän

poistumaan soluista, luultavasti eksosytoosia muistuttavan prosessin avulla (Grant ym., 1999). Ihmisistä eristetyt *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannat ovat myös geneettisesti läheisempää sukua keskenään kuin ympäristöstä eristetyt saman biotyypin kannat (Burnens ym., 1996). Tulokset voisivat viitata mahdolliseen ihmisille patogeeniseen alaryhmään *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen sisällä, vaikka tunnettujen virulenssigeenien esiintyvyyttä biotyypin 1A kannoissa tutkittaessa ei ole ilmennyt eroja kliinisten ja ympäristöstä eritettyjen kantojen välillä (Bhagat ja Viridi, 2007). Koko genomien vertailuun perustuvilla menetelmillä eroja ei ole havaittu myöskään oireita aiheuttavien ja oireettomilta ihmisiltä eristettyjen biotyypin 1A kantojen välillä, mikä voisi viitata isännän immuunipuolustuksen merkitykseen näiden kantojen taudinaiheuttamiskyvyssä (Howard ym., 2006).

Tutkimuksissa sairailta ihmisiltä eristetyiltä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilta on löytynyt sekvenssejä, joita ympäristöstä eristetyiltä biotyypin 1A kannoilta ei löydy. Näistä sekvensseistä on tunnistettu hyönteistoksiinia koodittavien geenien (TC-geenien) homologeja, *tcbA*, *tcaC* ja *tccC*, joita löytyy monilta hyönteisistä infektoivilta bakteerilajeilta, joista osa voi olla opportunistisia patogeeneja myös ihmisille (Tennant ym., 2005). Myös *Y. pestis*-kannoilla on TC-geenien homologeja ja niiden on arveltu auttavan bakteeria elämään vektorissaan kirpussa tappamatta sitä (Parkhill ym., 2001). Tutkimuksissa *Y. enterocolitica* TC -mutantit ovat kolonisoineet hiiren ruoansulatuskanavaa heikommin kuin luonnolliset *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannat. TC-geenien koodittamat proteiinit saattavat siis vaikuttaa kannan virulenssiin hiirellä, mutta niiden tarkkaa roolia ei tiedetä. TC-geenien esiintyvyys ihmisistä eristetyillä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilla on suurempi kuin muualta eristetyillä yersinia-kannoilla, mutta kuitenkin vain noin kolmasosa kyseisistä kannoista kantoi TC-geenejä (Tennant ym., 2005). Lisäksi TC-geenien transkriptio on lämpötilasäädelyä ja minimissään kehon lämpötilassa. Tutkimuksissa *Y. enterocolitican* toksiiniaktiivisuutta hyönteisille on havaittu vain matalissa lämpötiloissa (+10 °C) kasvatetulla kannoilla (Bresolin ym., 2006).

1.8 *Y. enterocolitica* kaltaisten lajien kliininen merkitys

Kuten *Y. enterocolitica* biotyypin 1A, myös jotkin *Y. enterocolitica* kaltaiset lajit on yhdistetty vatsaoireisiin ja niitä on tutkimuksissa eristetty sairaiden ihmisten ulostenäytteistä (Loftus ym., 2002; Bisset ym., 1990). Kannoilta puuttuvat perinteiset patogeenisuuden merkit, kuten pYV-virulenssiplasmidi. Joiltakin *Y. kristensenii* ja *Y. intermedia* kannoilta on löytynyt toksiinigeenin *yst* homologi (Delor ym., 1990; Kwaga ym., 1992). Ja vaikka kyseiset kannat eivät *yst*-geenin läsnäolosta huolimatta tuottaneet toksiinia, Ramamurthy ym. (1997) raportoivat *yst*-positiivisesta *Y. intermedia*-kannasta, joka myös tuotti toksiinia. Myös *Y. bercovieri*-kannoilta on tutkimuksissa havaittu löytyvän enterotoksiiniaktiivisuutta (Sulakvelidze, 1999) samoin kuin joiltain *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae* sekä *Y. intermedia* -kannoilta (Kapperud, 1982). Toisaalta myös enterotoksiini-negatiiviset kannat on yhdistetty erilaisiin oireisiin ja ne ovat tutkimuksissa osoittautuneet eläimille tautia aiheuttaviksi. Onkin oletettu että kyseisillä kannoilla olisi muita patogeenisuuteen vaikuttavia tekijöitä. *ail*-geenin esiintyvyyttä ei ole kuitenkaan voitu yhdistää *Y. enterocolitica* kaltaisten kantojen aiheuttamiin oireisiin ja myös *inv*-geenin merkitys on ristiriitainen, vaikka *Y. enterocolitica* kaltaisilta kannoilta *inv*-homologi kromosomista löytyykin (ks. yleiskatsaus Sulakvelidze, 2000). Kuitenkin toksiinia tuottava, mutta *inv*- ja *ail* -negatiivinen *Y. bercovieri*-kanta on tutkimuksissa osoittautunut invasoituvan 3–5 kertaa tehokkaammin soluihin kuin patogeeninen virulenssiplasmidia kantava *Y. enterocolitica*-kanta (Sulakvelidze, 2000). Ilmiön mekanismeja ei tunneta, mutta tiettyjen elimistön valkosolujen epäillään liittyvän tapahtumaan. Polymorfonukleaaristen (PMN) leukosyyttien on tutkimuksissa havaittu pystyvän kuljettamaan eläviä yersiniabakteereita keinokehoisten solurakenteiden läpi (Rüssmann ym., 1996) ja *Y. enterocolitica* kaltaisten lajien kannat saattaisivat käyttää samanlaista mekanismia. Samoin kuin *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannat, myös kliiniset *Y. kristensenii*-kannat ovat tutkimuksissa paljastuneet olevan keskenään läheisempää sukua kuin ympäristöstä eristetyt *Y. kristensenii*-kannat (Dolina ja Peduzzi, 1993).

1.9 Yersinioiden esiintyminen Suomessa

1.9.1 Esiintyminen ympäristössä

Y. enterocolitica tavataan endeemisenä Suomessa, mutta sen tarkasta esiintymisestä luonnossa ei tiedetä. Salaatti-, maa- ja vesinäytteistä on eristetty sekä patogeenisiin *Y. enterocolitica* biotyyppeihin kuuluvia kantoja että ei-patogeenisiin *Yersinia*-lajeihin kuuluvia kantoja (Niskanen ym., 2001). Tutkimuksissa myös villieläimistä on eristetty ei-patogeenisina pidettyjä *Yersinia*-lajeja ja *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantoja (Kemper ym., 2006; Niskanen ym., 2001). Kuten muualla maailmassa, myös Suomessa patogeenisiä *Y. enterocolitica* bioserotyypin 4/O:3 kantojen aiheuttamia infektioita on yhdistetty sikaan ja sianlihatuotteisiin (Fredriksson-Ahomaa ym., 2001a). Myös raakaa sianlihaa tai sian sisäelimiä syöneistä koirista ja kissoista on eristetty samoja patogeenisiä *Y. enterocolitica* serotyyppejä kuin sioista (Fredriksson-Ahomaa ym., 2001b). Pastöroimattomasta maidosta on Suomessa eristetty *Y. enterocolitica* bakteereja, mutta ne ovat kuuluneet ei-patogeeniseen biotyyppiin 1A (Hänninen ja Raevuori, 1981). *Y. enterocolitican* esiintyvyyttä muissa elintarvikkeissa on tutkittu Suomessa vähän.

1.9.2 Infektioiden esiintyvyys

Yersiniat ovat salmonellojen ja kampylobakteerien jälkeen yleisimpiä kuumeisen suolistoinfektion aiheuttavia bakteereita Suomessa. Salmonella tartunnoista tosin 80 % on saatu ulkomailta samoin kuin yli puolet kampylobakteeritartunnoista. *Y. enterocolitican* esiintyvyys on ollut samaa suuruusluokkaa kotimaisten salmonellatartuntojen kanssa ja *Y. enterocolitica* voidaankin pitää yhtenä tärkeimpänä zoonoosin aiheuttajana Suomessa. *Y. enterocolitica*-infektiot ovat yleensä yksittäisiä. Vuonna 1995 valtakunnalliseen tartuntatautireksiteriin ilmoitettiin yhteensä 873 *Y. enterocolitica*-tapausta (www.ktl.fi). Tapausten määrä on sen jälkeen hieman vähentynyt. Eniten patogeenisten serotyyppien aiheuttamia *Y. enterocolitica*-tapauksia todetaan pienillä lapsilla (1–4 vuotta) vaikkakin tapausmäärät ikäryhmässä ovat laskeneet. Vanhuksilla (yli 75 vuotta täyttäneet), joilla myös esiintyy runsaasti *Y. enterocolitica* infektioita, ovat tapaukset hiukan nousseet (Huovinen ym., 2006). *Y. enterocolitican* aiheuttamat epidemiat ovat Suomessa erittäin harvinaisia. *Y. enterocolitica* serotyyppi O:3 aiheutti epidemian vuonna 1982. Infektiot

yhdistettiin työpaikkaruokalaan, mutta tartuntalähdettä ei saatu selvitettyä (Tuori ja Valtonen, 1983). Viimeksi vuonna 2003 *Y. enterocolitica* serotyyppi O:3 aiheutti myös työpaikkaruokailuun liitetyn epidemian. Tutkimuksista huolimatta epidemian välittäjänä toiminutta elintarviketta ei saatu selville (Hatakka ym., 2004).

1.10 Laboriodiagnostiikka

1.10.1 Yersinian osoittaminen viljelyllä kliinisistä näytteistä

Yersiniabakteerit kasvavat useimmilla enterobakteerialustoilla, mutta jäävät hitaan kasvuvauhtinsa takia usein muiden näytteessä olevien lajien alle +37 °C:ssa kasvatettaessa. *Yersinia*-lajien valikoivaan ja erottelevaan eristämiseen voidaan käyttää juuri siihen tarkoitukseen kehitettyä Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin -agaria (CIN-agar) (Schiemann, 1979), joka estää useiden muiden bakteerilajien kasvua. Yersiniapesäkkeet näkyvät maljalla keskustastaan tummanpunaisiksi värjäytyneinä niin sanottuina häränsilmäpesäkkeinä (bull's eye) seurauksena mannitolin fermentoinnista. Ennen CIN-agarille viljelemistä tai sen rinnalla käytetään yersinianäytteille myös kylmärikastusta (esimerkiksi lihaliemessä +4 °C:ssa 5–7 vrk). Yersiniat pystyvät lisääntymään jääkaappilämpötilassa, jossa useat muut suolistopatogeenit eivät menesty. Kylmärikastuksen käyttö lisää yersiniabakteerien eristämistä, mutta voi suosia ei-patogeenisina pidettyjä kantoja (van Noyen ym., 1980; Ratnam ym., 1982; Noble ym., 1987).

1.10.2 Yersinioiden lajimääritys ja fenotyypitys

Yersinia-lajien erotus toisistaan tapahtuu perinteisesti biokemiallisten testien avulla (ks. yleiskatsaus Bottone, 1997) (Taulukko 3). Bakteerien tunnistaminen on työlästä ja tunnistukseen kliinisissä mikrobiologian laboratorioissa käytetyt kaupalliset kitit, kuten Vitek GNI Card (BioMerieux, Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA), Micronaut E (Merlin, Bornheim-Hersel, Saksa) sekä API 20E ja API Rapid 32 IDE (BioMerieux, Nürtingen, Saksa), eivät tunnista ei-patogeenisina pidettyjä *Yersinia*-lajeja ja liittävät ne usein

Taulukko 3: Eri *Yersinia* lajien biokemialliset ominaisuudet*

| TESTI | LAJINOMAINEN REAKTIO [†] | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|------------------|-------------------|----|
| | <i>Y. enterocolitica</i> | <i>Y. pseudotuberculosis</i> | <i>Y. pestis</i> | <i>Y. fredericksonii</i> | <i>Y. intermedia</i> | <i>Y. kristensenii</i> | <i>Y. mollaretii</i> | <i>Y. bercovieri</i> | <i>Y. aldovae</i> | <i>Y. rhodei</i> | <i>Y. ruckeri</i> | |
| Fermentaatio | | | | | | | | | | | | |
| Glukoosi | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sakkarooosi | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + | - | - |
| Ramnoosi | - | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Raffinoosi | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | v | v |
| Melibioosi | - | + | v | - | + | - | - | - | - | v | - | - |
| Sellobioosi | + | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - |
| Sorboosi | v | - | - | + | + | + | + | - | - | ET | ET | ET |
| ODC ¹ | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| VP ² (+25°C) | + | - | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Indolin tuotto | v | - | - | + | + | v | - | - | - | - | - | - |
| Ureaasin tuotto | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Liikkuvuus (+25°C) | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

* Mukailtu yleiskatsaus Bottone 1997

[†] + , positiivinen; -, negatiivinen; v, vaihteleva; ET, ei tietoa; 1, Ornitiinidekarboksylaasi; 2, Voges-Proskauer

Y. enterocolitica-lajiin kuuluviksi (Linde ym., 1999; Neubauer ym., 1998). Hyväksi apukeinoksi patogeenisten yersinioiden erottamiseksi ei-patogeenisista on havaittu lajinomaisen pesäkemorfologian tarkastelu CIN-agarilla maljamikroskoopin avulla (Hallanvuori ym., 2006). Patogeenisten ja ei-patogeenisten kantojen erottamiseen toisistaan käytetään lisäksi Kongopuna-magnesiumoksalaatti – agarilla (CR-MOX -agar) (Riley ja Toma, 1989). CR-MOX -agarin avulla pystytään toteamaan pesäkkeiden kalsiumista riippuvainen kasvu +37 °C:ssa sekä ominaisuus sitoa kongo-punaa. Molempia ominaisuuksia koodittavat geenit sijaitsevat pYV -virulenssiplasmidissa, joka on vain patogeenisilla *Y. enterocolitica*-kannoilla. Nykyään myös erilaisia DNA:han perustuvia menetelmiä voidaan käyttää lajimääritykseen. Esimerkiksi *Yersinia*-suvun bakteereille spesifistä invasiini-geenialuetta (*inv*) tunnistavaa aluetta on käytetty erottamaan yersiniat muista bakteereista (Robins-Browne ym., 1989). Attachment and invasion locus-geenialueen (*ail*) tunnistava alue taas erottaa patogeeniset *Yersinia*-lajit ei-patogeenisista, koska kyseinen geeni on läsnä vain tautia aiheuttavien kantojen kromosomissa (Miller ym., 1989). Jos muilla keinoin bakteerien tunnistaminen ei onnistu tai halutaan varmistaa lajinmäärityksen tulos, käytetään apuvälineenä usein sekvenssointia. Lajinmääritys sekvenssoinnilla perustuu tiettyjen kaikissa bakteereissa esiintyvien geenien nukleotidisekvenssien eroihin eri lajeilla. 16S rRNA-geeni, joka koodittaa ribosomin 16S alayksikön RNA:ta, on yleisesti bakteerilajien tunnistamiseen sekvenssoimalla käytetty geeni. Kyseinen geeni on muuttunut hitaasti evoluution aikana ja se siis löytyy kaikilta bakteerilajeilta. Sekvenssivertailut tehdään suureen 16S rRNA-geeni kirjastoon ja menetelmä on erittäin luotettava. Menetelmän ongelmana on, ettei se aina riitä erottelemaan hyvin läheistä sukua olevia lajeja toisistaan. Menetelmää on käytetty myös *Yersinia*-lajien erottelemiseksi (Neubauer ym., 2000).

Biokemiallisesti bakteerin voidaan olettaa olevan *Y. enterocolitica* jos sillä on anaerogeeninen glukoosin ja tiettyjen muiden hiilihydraattien fermentaatio (Taulukko 3), se tuottaa ureaasia, on liikkuva +25 °C:ssa, muttei +37 °C:ssa ja siltä puuttuvat oksidaasi-, fenyylialaniinideaminaasi-, lysiinidekarboksylaasi- sekä arginiinidihydrolaasiaktiivisuudet (ks. yleiskatsaus Bottone, 1997). Biotyyppityksen avulla *Y. enterocolitica*-kannat voidaan edelleen jakaa kuuteen biokemiallisesti eroavaan ryhmään, jotka korreloivat myös serotyypin kanssa. Serotyypityksen ongelmana on, että tarvitaan suuri valikoima antiseerumeita, jotka ovat hankalia ja kalliita valmistaa. Yleisesti kliinisissä laboratorioissa

yersiniakannoilta tutkitaan vain serotyypit O:3, O:5, O:8, O:9 ja O:27 mahdollisen patogeenisuuden selvittämiseksi.

1.10.3 Pulssikenttägeelelektroforeesi (PFGE) Yersinioiden genotyypityksessä

1.10.3.1 Menetelmän periaate

PFGE on agarosigeelelektroforeesin variaatio, jonka avulla voidaan erotella suuriakin DNA-paloja. PFGE-menetelmässä käytetään harvaan pilkkovia restriktioentsyymejä, joiden avulla bakteerin koko genomi voidaan katkoa erikokoisiksi palasiksi. Kun DNA-paloja erotellaan pulssikentässä ne venyvät pitkiksi ja alkavat vaeltaa geelissä sähkökentän suuntaisesti. Ensimmäinen sähkökenttä kytketään pois ja seuraava kenttä, joka on suunnaltaan tiettyssä kulmassa ensimmäiseen, aktivoidaan. Välissä DNA:n on muutettava konformaatiota ja suuntaa voidakseen liikkua toisen sähkökentän suuntaisesti. Suunnanmuutokseen kuluva aika on suoraan verrannollinen molekyylin pituuteen, joten suurilla molekyyleillä suunnan muutos kestää kauemmin kuin pienemmillä. Kun vaihtuvat kentät ovat samanlaisia pituuden ja volttien suhteen, DNA kulkee geelissä suoraa linjaa, joka on tehtyjen sähkökentän suunnanmuutosten summa. Menetelmän avulla saadaan suhteellisen helposti analysoitava profiili bakteerin koko genomista. PFGE:n erottelukyky on hyvä ja koneellistettu geelien analysointi ja vertailu tietokoneohjelmien avulla on mahdollista. PFGE vaatii kuitenkin kehittyneen laitteiston ja menetelmä on suhteellisen hidas suorittaa. Tulosten saamiseen kuluu useita päiviä.

1.10.3.2 Soveltuvuus Yersinioille

Y. enterocolitica bio- ja serotyypit korreloivat hyvin keskenään ja saman bioserotyypin kantoja on lähes mahdotonta erottaa toisistaan klassisten tyypitysmenetelmien avulla (ks. yleiskatsaus Fredriksson-Ahomaa ym., 2006). PFGE-menetelmää on käytetty karakterisoimaan *Y. enterocolitica*-kantoja tarkemmin ja se onkin osoittautunut hyväksi epidemiologiseksi työkaluksi. Eri lähteistä ja eri puolilta maailmaa eristetyt samaa serotyyppiä edustavat kannat erottuvat muista serotyypeistä spesifisten PFGE-profiilien perusteella (Buchrieser ym., 1994; Saken ym., 1994). Bioserotyypin 4/O:3 kantojen PFGE-tyyppien samankaltaisuus on korkea ympäri maailman tehdyissä tutkimuksissa (Najdenski ym., 1994; Saken ym., 1994; Iteman ym., 1996; Asplund ym., 1998). Useita eri

restriktioentsyymejä käytettäessä saadaan kannat erotettua alatyyppeihin (Fredriksson-Ahomaa ym., 1999). Yleisimmin *Y. enterocolitica* tyypittämiseen käytetty restriktioentsyymi on ollut *NotI* (Saken ym., 1994; Pilon ym., 2000; Thisted Lamberzt ja Danielsson-Tham., 2005). Myös muita entsyymejä, kuten *XbaI* ja *SpeI*, on käytetty *Y. enterocolitica*-kantojen tyypittämiseen (Najdenski ym., 1994; Filetici ym., 2000).

Esimerkiksi sian nielurisoista eristettyjen saksalaisten ja suomalaisten kantojen genotyypit erosivat toisistaan *NotI*, *ApaI* ja *XhoI* restriktioentsyymeillä tutkittaessa (Fredriksson-Ahomaa ym., 2003).

PFGE erottelee *Y. enterocolitica* patogeeniset serotyypit ja ei-patogeenisena pidetyt tyypit ja lajit tehokkaasti toisistaan (Buchrieser ym., 1994). Vaikka patogeeniset serotyypit ovat PFGE-tutkimuksissa varsin konservoituneita, voi samaan serotyyppiin kuuluvilla *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilla olla lukuisia eri PFGE-tyyppejä (Najdenski ym., 1994). *Y. enterocolitica* kaltaisia kantoja on tutkittu PFGE:n avulla vähän. Tutkimuksissa *Y. enterocolitica* kaltaisten kantojen PFGE-tyypit ovat kuitenkin olleet erilaisia verrattuna *Y. enterocolitica* -kantojen PFGE-tyyppeihin (Buchrieser ym., 1994).

1.10.4 Muita molekyylogeneettisiä tyypitysmenetelmiä

Monia muita DNA:han perustuvia molekyylogeneettisiä menetelmiä, kuten Amplified Fragment Length Polymorfism (AFLP) -menetelmää (Vos ym., 1995) on käytetty *Y. enterocolitica* kantojen tyypittämiseen (Fearnley ym., 2005; Kuehni-Boghenbor ym., 2006). AFLP-menetelmässä monistetaan selektiivisesti koko genomista restriktioentsyymeillä pilkottuja kappaleita spesifisten alukkeiden ja polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla. Menetelmä erottelee patogeeniset yersiniakannat bio- ja serotyypin mukaan, ja biotyypin 1A kantojen heterogeenisuus on paljastunut myös näissä tutkimuksissa (Kuehni-Boghenbor ym., 2006). Myös Repetitive Extragenic Palindrome (REP) sekä Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) -sekvensseihin perustuvia menetelmiä on käytetty yersiniakantojen tyypittämiseen. Myös REP ja ERIC -menetelmissä käytetään PCR:ta ja alukkeita, jotka tunnistavat toistuvan sekvenssin bakteerien genomissa. Tutkimuksissa menetelmillä on löydetty ihmisestä ja siasta eristetyistä *Y. enterocolitica*-kannoista samanlaisia REP/ERIC-tyyppejä (Wojciech ym., 2004) ja menetelmien on todettu ryhmittelevän biotyypin 1A kantoja paremmin

verrattuna PFGE-menetelmään (Sachdeva ja Viridi, 2004). Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats (MLVA) -menetelmä perustuu samoin tiettyjen toistuvien sekvenssien esiintymiseen bakteerin DNA:ssa, mutta tällä uudella menetelmällä on tutkimuksissa saatu parempi erottelukyky *Y. enterocolitica* bioserotyyppin 4/O:3 kantoja tyyjitettäessä (Gierczyński ym., 2007).

2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämän pro gradu tutkimuksen tavoitteena oli:

- I. kartoittaa ihmisistä Suomessa eristettyjen *Y. enterocolitica* biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen geneettistä monimuotoisuutta pulssikenttägeelelektroforeesin avulla
- II. tutkia esiintyykö *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilla ja *Y. enterocolitican* kaltaisten lajien kannoilla lämpökestoista enterotoksiinia koodittavia *yst*-geenejä PCR:n ja DNA-sekvensoinnin avulla
- III. tarkastella PFGE-tulosten, toksinigeenien esiintyvyyden ja potilaiden oireiden yhteyttä toisiinsa.

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Bakterikannat

Tutkimuksessa oli mukana yhteensä 105 Suomessa eristettyä yersiniakantaa (Taulukko 4). Kannat oli eristetty ihmisistä (n=98) ja elintarvikkeista (n=7). Ihmisistä eristetyt kannat jakautuivat seuraavasti: *Y. enterocolitica* biotyypin 1A (n=80), *Y. bercovieri* (n=7), *Y. frederiksenii* (n=6), *Y. mollaretii* (n=3), *Y. kristensenii* (n=2), *Y. intermedia* (n=2) ja *Y. rohdei* (n=1). Elintarvikkeista eristetyt kannat olivat *Y. enterocolitica* biotyypin 1A (n=4), *Y. kristensenii* (n=2)- ja *Y. bercovieri* (n=1) -kantoja. Ihmisistä eristetyt kannat olivat suomalaisten kliinisten mikrobiologian laboratorioden ulostenäytteistä eristämisiä yersiniakantoja. Elintarvikekannat oli eristetty salaateista TavastLabissa (Hämeenlinnan seudun kansanterveystyön kuntayhtymän Ympäristö- ja elintarvikelaboratorio) ja tutkimus liittyi Kouvolan terveysvalvonnan projektiin, jossa selvitettiin yersiniabakteerien esiintyvyyttä vanhainkodeissa tarjolla olleissa vihersalaateissa ja raasteissa. Kyseisissä vanhainkodeissa oli todettu ripulinäytteistä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantoja. Kaikki kannat olivat vuoden 2006 tammikuun ja toukokuun alun väliseltä ajalta. Kylmärikastusta oli käytetty yhteensä 60 kannan eristyksessä ja suoraviljelyn avulla selektiiviselle CIN agarille oli eristetty 45 kantaa. Neljä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A löydöstä liittyi tapauksiin, joissa potilailta oli löytynyt myös *Y. enterocolitica* O:3 (tutkimusnumero 6), *Salmonella enterica* (tutkimusnumero 29), *Staphylococcus aureus* (tutkimusnumero 51) ja *Campylobacter jejuni* (tutkimusnumero 63) ja yksi *Y. frederiksenii* löydös liittyi tapaukseen jossa oli löytynyt myös *Salmonella* Typhimurium (tapausnumero 85). Tutkimuksessa mukana oleville kannoille oli tehty lajinmääritys biokemiallisten testien ja pesäkemorfologian avulla. *Y. enterocolitica*-kannat oli biotyypitetty. Kantojen eristyksen jälkeiset tutkimukset oli tehty Kansanterveislaitoksen suolistobakteerilaboratoriossa. Kontrollikantoina käytettiin *Salmonella* Braenderup RHS 6098 kantaa (kappale 3.2.3) ja *Y. enterocolitica* O:3 FE80704 kantaa (kappale 3.3.2). Kannat oli säilötty maitoputkiin -70 °C:een pakastimeen.

Taulukko 4: Tutkimuksen kannat

| tutk. nro. | laji | kanta-nro. | näytteen ottopvm. | eristetty | tutk. nro. | laji | kanta-nro. | näytteen ottopvm. | eristetty | tutk. nro. | laji | kanta-nro. | näytteen ottopvm. | eristetty |
|------------|---------------------------------|--------------|-------------------|----------------|------------|---------------------------------|--------------|-------------------|----------------|------------|--------------------------------|--------------|-------------------|----------------|
| 1 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80044 | 5.1.2006 | ihminen | 36 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80418 | 10.2.2006 | ihminen | 71* | <i>Y. enterocolitica</i> | 81004 | 4.4.2006 | ihminen |
| 2 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80045 | 9.1.2006 | ihminen | 37* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80429 | 12.2.2006 | ihminen | 72 | <i>Y. enterocolitica</i> | 81005 | 10.4.2006 | ihminen |
| 3* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80053 | 2.1.2006 | ihminen | 38* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80430 | 12.2.2006 | ihminen | 73* | <i>Y. enterocolitica</i> | 81006 | 1.4.2006 | ihminen |
| 4* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80079 | 3.1.2006 | ihminen | 39 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80444 | 21.2.2006 | ihminen | 74* | <i>Y. enterocolitica</i> | 81007 | 31.3.2006 | ihminen |
| 5* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80082 | 5.1.2006 | ihminen | 40 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80447 | 20.2.2006 | ihminen | 75* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80987 | 1.4.2006 | ihminen |
| 6* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80088 | 5.1.2006 | ihminen | 41 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80446 | 20.2.2006 | ihminen | 76 | <i>Y. enterocolitica</i> | 81009 | 6.4.2006 | ihminen |
| 7* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80055 | 3.1.2006 | ihminen | 42 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80468 | 20.2.2006 | ihminen | 77* | <i>Y. enterocolitica</i> | 81473 | 28.4.2006 | elintarvike |
| 8* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80054 | 3.1.2006 | ihminen | 43* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80469 | 17.2.2006 | ihminen | 78 | <i>Y. enterocolitica</i> | 81490 | 4.5.2006 | elintarvike |
| 9* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80138 | 2.1.2006 | ihminen | 44* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80470 | 16.2.2006 | ihminen | 79 | <i>Y. enterocolitica</i> | 81491 | 4.5.2006 | elintarvike |
| 10 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80140 | 3.1.2006 | ihminen | 45 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80533 | 27.2.2006 | ihminen | 80 | <i>Y. enterocolitica</i> | 81494 | 4.5.2006 | elintarvike |
| 11 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80150 | 16.1.2006 | ihminen | 46* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80556 | 22.3.2006 | ihminen | 81* | <i>Y. bercovieri</i> | 80153 | 11.1.2006 | ihminen |
| 12* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80152 | 12.1.2006 | ihminen | 47* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80588 | 22.2.2006 | ihminen | 82* | <i>Y. intermedia</i> | 80200 | 12.1.2006 | ihminen |
| 13 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80175 | 17.1.2006 | ihminen | 48* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80647 | 27.2.2006 | ihminen | 83* | <i>Y. frederiksenii</i> | 80151 | 5.1.2006 | ihminen |
| 14 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80178 | 19.1.2006 | ihminen | 49 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80648 | 10.3.2006 | ihminen | 84 | <i>Y. intermedia</i> | 80253 | 22.1.2006 | ihminen |
| 15 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80183 | 19.1.2006 | ihminen | 50 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80646 | 7.3.2006 | ihminen | 85* | <i>Y. frederiksenii</i> | 80258 | 13.1.2006 | ihminen |
| 16* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80202 | 17.1.2006 | ihminen | 51* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80728 | 6.3.2006 | ihminen | 86* | <i>Y. mollaratii</i> | 80304 | 25.1.2006 | ihminen |
| 17* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80216 | 19.1.2006 | ihminen | 52* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80729 | 7.3.2006 | ihminen | 87* | <i>Y. kristensenii</i> | 80334 | 30.1.2006 | ihminen |
| 18 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80217 | 25.1.2006 | ihminen | 53* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80727 | 6.3.2006 | ihminen | 88* | <i>Y. bercovieri</i> | 80392 | 3.2.2006 | ihminen |
| 19* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80255 | 18.1.2006 | ihminen | 54 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80757 | 14.3.2006 | ihminen | 89 | <i>Y. frederiksenii</i> | 80477 | 20.2.2006 | ihminen |
| 20 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80257 | 24.1.2006 | ihminen | 55* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80766 | 14.3.2006 | ihminen | 90* | <i>Y. intermedia</i> | 80517 | 13.2.2006 | ihminen |
| 21 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80259 | 24.1.2006 | ihminen | 56 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80775 | 20.3.2006 | ihminen | 91 | <i>Y. mollaratii</i> | 80518 | 21.2.2006 | ihminen |
| 22 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80260 | 24.1.2006 | ihminen | 57* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80791 | 15.3.2006 | ihminen | 92* | <i>Y. bercovieri</i> | 80555 | 22.2.2006 | ihminen |
| 23* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80261 | 21.1.2006 | ihminen | 58* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80792 | 15.3.2006 | ihminen | 93* | <i>Y. bercovieri</i> | 80587 | 21.2.2006 | ihminen |
| 24* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80287 | 20.1.2006 | ihminen | 59 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80800 | 21.3.2006 | ihminen | 94 | <i>Y. bercovieri</i> | 80940 | 31.3.2006 | ihminen |
| 25* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80328 | 27.1.2006 | ihminen | 60* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80819 | 20.3.2006 | ihminen | 95* | <i>Y. frederiksenii</i> | 80758 | 9.3.2006 | ihminen |
| 26* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80367 | 30.1.2006 | ihminen | 61* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80837 | 21.3.2006 | ihminen | 96* | <i>Y. bercovieri</i> | 80989 | 29.3.2006 | ihminen |
| 27 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80313 | 1.2.2006 | ihminen | 62 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80890 | 27.3.2006 | ihminen | 97* | <i>Y. bercovieri</i> | 80870 | 16.3.2006 | ihminen |
| 28 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80303 | 3.2.2006 | ihminen | 63* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80891 | 20.3.2006 | ihminen | 98* | <i>Y. rohdei</i> | 80667 | 6.3.2006 | ihminen |
| 29 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80355 | 7.2.2006 | ihminen | 64* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80931 | 22.3.2006 | ihminen | 99* | <i>Y. frederiksenii</i> | 80860 | 20.3.2006 | ihminen |
| 30* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80377 | 6.2.2006 | ihminen | 65* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80936 | 28.3.2006 | ihminen | 100* | <i>Y. kristensenii</i> | 80982 | 24.3.2006 | ihminen |
| 31 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80335 | 1.2.2006 | ihminen | 66* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80937 | 28.3.2004 | ihminen | 101* | <i>Y. frederiksenii</i> | 80988 | 3.4.2006 | ihminen |
| 32 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80384 | 13.2.2006 | ihminen | 67* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80938 | 26.3.2006 | ihminen | 102* | <i>Y. intermedia</i> | 80939 | 27.3.2006 | ihminen |
| 33 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80385 | 13.2.2006 | ihminen | 68 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80950 | 2.4.2006 | ihminen | 103 | <i>Y. kristensenii</i> | 81334 | 20.4.2006 | elintarvike |
| 34 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80420 | 15.2.2006 | ihminen | 69* | <i>Y. enterocolitica</i> | 80960 | 28.3.2006 | ihminen | 104 | <i>Y. kristensenii</i> | 81492 | 4.5.2006 | elintarvike |
| 35 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80419 | 15.2.2006 | ihminen | 70 | <i>Y. enterocolitica</i> | 80961 | 3.4.2006 | ihminen | 105 | <i>Y. bercovieri</i> | 81493 | 4.5.2006 | elintarvike |

Kaikki *Y. enterocolitica* kannat kuuluivat biotyyppiin 1A. * rikastuksen avulla eristetyt kannat. Tummennetulla kannat joilla toinen löydös; 6: *Y. enterocolitica* O:3, 29: *Salmonella enterica*., 51: *S.aureus*, 63: *C. jejuni*, 85: *S. Typhimurium*

3.2 PFGE

3.2.1 DNA:n eristäminen

Bakteerikantojen DNA eristettiin PFGE-tutkimusta varten seuraavan ohjeen mukaan. Yhden vuorokauden +30 °C:ssa R1-agarilla (Liite) kasvaneista tutkittavista puhdasviljelmistä otettiin CBS-putkeen (Liite) bakteerimassaa sen verran että fotometrin (Gene-Trak Systems, Hopkinton, MA, USA) lukema oli 0,38–0,39 A aallonpituudella 480 nm. Putkista pipetoitiin tämän jälkeen 400 µl suspensiota 1,5 ml eppendorf-putkeen ja lisättiin 25 µl lysotsyymiä (19 mg/ml) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa). Eppendorf-putket sekoitettiin ja inkuboitiin +37 °C:ssa noin 15 minuuttia. Tämän jälkeen putket siirrettiin +50 °C:een lämpöhauteeseen ja niihin pipetoitiin 400 µl 1 % agarosia (SeaKem Gold Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) ja 13 µl proteinaasi K:ta (15,3 mg/ml) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa). Putket sekoitettiin hyvin ja pipetoitiin pestyihin ja kuiviin muotteihin, jotka olivat lasilevyllä jään päällä. Seoksen jähmetyttyä muotteihin palaset siirrettiin spaattelin avulla putkiin, joissa oli 3 ml lyysis-puskuria (Liite) ja 19,5 µl proteinaasi K:ta. Paloja inkuboitiin +54 °C:een ravistelevassa vesihauteessa kaksi tuntia, jonka jälkeen ne pestiin kaksi kertaa 20–25 ml steriilillä vedellä ja kolme kertaa steriilillä TE-puskurilla (Liite) +50 °C:een lämpötilassa ravistelevassa vesihauteessa, noin 15 minuuttia per pesu. Lopuksi geelin palat siirrettiin säilytysputkiin, jossa oli steriiliä TE-puskuria.

3.2.2 DNA:n pilkkominen restriktioentsyymillä

Digestiopuskuri 3 (New England BioLabs, Inc. Ipswich, MA, USA) laimennettiin 1:10 steriiliin veteen. Eppendorf-putkeen pipetoitiin 100 µl puskuria ja lisättiin noin 1 mm levyinen geelin palasta leikattu siivu. Näiden siivujen annettiin tasapainottua puskurissa 30 minuuttia, jonka jälkeen puskuri vaihdettiin ja lisättiin 0,8 µl *NotI*-restriktioentsyymiä (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA). Putkia sekoitettiin varovasti ja inkuboitiin +37 °C:ssa yön yli. Menetelmän testaamiseksi kaksi *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantaa tutkittiin tutkimusten aluksi myös *XbaI* restriktioentsyymillä (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa).

3.2.3 Geelielektroforeesi

Seuraavana päivänä PFGE-ajoa varten valmistettiin 1,2 % -agarosigeeli (SeaKem® Gold, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 0,5 x TBE-puskuriin (Liite). Sula agarosii tasapainotettiin +50 °C:ssa lämpökaapissa. Geelinvalukaukalo koottiin ja pyyhittiin steriilillä vedellä. Geelistä leikattu siivu, joka sisältämä DNA oli pilkottu restriktioentsyymien avulla, nostettiin spaattelin avulla kamman päälle ja annettiin kuivua noin 5 minuuttia. Tämän jälkeen päälle pipetoitiin tippa tasapainotettua ajogeeliä, ettei siivu päässyt liikkumaan valun aikana. Tipan jähmettyttyä kampa asetettiin kaukaloon paikalleen ja geeli valettiin. Kun geeli oli jähmettynyt, kampa irrotettiin varovasti ja kamman kuopat täytettiin agarosigeelillä. Molekyylipainostandardina käytettiin *S. Braenderup* RHS 6098 kantaa, joka digestoitii *XbaI*-restriktioentsyymillä mutta käsiteltiin muuten samoin kuin tutkittavat kannat. PFGE-ajolaitteeseen valmistettiin 2 l 0,5 x TBE-puskuria, jonka annettiin jäähtyä +14 °C:een. Jähmettynyt agarosigeeli asetettiin ajolaitteeseen ja annettiin tasaantua noin 30 minuuttia, jonka jälkeen ajo laitettiin päälle. Ajon pulssiaika oli 1–8 s, jännite 6,0 V/cm ja ajoaika 20 h. Kun ajo oli valmis, geeliä värjäyttiin 45 minuutin ajan 0,5 x TBE-puskurissa, johon oli lisätty etidiumbromidia (konsentraatio noin 0,5 mg/ml). Tämän jälkeen geeli pestiin MQ-vedellä noin 30 minuuttia. Geeli kuvattiin värjäämisen jälkeen kuvantamislaitteella UV-valossa (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA).

3.2.4 Geelien analysointi

PFGE-geelien kuvat analysoitiin tietokoneella BioNumerics-ohjelmalla (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgia). Ohjelmaan luotiin tietokanta, johon geelikuvat tallennettiin. Jokaisen tutkittavan kannan erikokoisten DNA-palojen muodostama kuvio, eli profiili tarkastettiin silmämääräisesti ja linjattiin kokostandardin avulla. Geneettistä samankaltaisuutta tutkittiin DICE-kertoimen avulla, joka vertaa kantojen PFGE-profiilien DNA-palojen yhteneväisyyksiä ja eroja toisiinsa. Fylogeneettinen puu tehtiin etäisyyksiin perustuvan unweighted pair-group (UPGMA) -metodin avulla.

3.3 *yst*-geenien osoittaminen

Kaikkiaan 70/98 ihmisistä eristettyä kantaa tutkittiin *yst*-geenin osoittamiseksi PCR-menetelmällä. Kannat otettiin mukaan muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta aikajärjestyksessä alkaen vuoden 2006 alusta. Mukana oli 58 *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantaa ja 12 *Y. enterocolitican* kaltaista kantaa. *Y. enterocolitican* kaltaiset kannat olivat: *Y. bercovieri* (n=4), *Y. frederiksenii* (n=3), *Y. intermedia* (n=3), *Y. kristensenii* (n=1) ja *Y. mollaretii* (n=1).

3.3.1 DNA:n eristäminen

Tutkittavilta bakteerikannoilta eristettiin DNA:ta Thisted Lambertz ja Danielsson-Tham, (2005) mukaan kasvattamalla pesäkkeitä yön yli Drigalski-Conrad -agarilla (Liite) +30 °C:ssa ja poimimalla 5–10 pesäkettä eppendorffputkeen jossa oli 90 µl steriiliä vettä ja 10 µl 0,8 M natriumhydroksidia. Putkia inkuboitiin 10 minuuttia +70–75 °C:ssa, jonka jälkeen lisättiin 24 µl 0,8 M suolahappoa ja 24 µl 1,0 M Tris-puskuria (pH 8,3). Putket sekoitettiin hyvin ja sentrifugattiin 1 minuutti 14 000 x g. DNA:n sisältävä kerros pipetoitiin puhtaaseen eppendorff-putkeen. DNA:n pitoisuus mitattiin Nanodrop-1000 spektrofotometrillä (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, USA) eristyksen onnistumisen varmistamiseksi ja konsentraation määrittämiseksi. Eristetyt DNA:t säilytettiin -20 °C:ssa.

3.3.2 Monistus PCR:lla

Alukkeet suunniteltiin PCR-menetelmää varten *yst*-geenialueen nukleinihapposekvenssin mukaan siten, että ne tunnistaisivat *ystB*:n lisäksi myös *ystA* ja *ykst* geenien sekvenssit. Sekvensointia varten alukkeet suunniteltiin tarttumaan myös mahdollisimman lähelle geenin alkua ja loppua. Monistuvan alueen pituus oli noin 200 emäsparia. Alukkeet olivat seuraavat; Yst-F: TGAAAAAGATARTTTTKGYTCT, Yst-R: CTAGCARCCMGCACASGC (R=A/G, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, S=G/C) ja ne tilattiin Oligomer Oy:ltä (Helsinki, Suomi). PCR-reaktio tehtiin 1 x PCR-puskurissa, 20 µl reaktiotalavuudessa. Reaktion nukleotidikonsentraatio (Finnzymes, Espoo) oli 250 µM, alukekonsentraatiot 0,5 µM ja DNA polymeraasia (DyNAzyme™, Finnzymes,

Espoo)käytettiin 0,4 U. Betaiinin (Sigma, Saint Louis, MI, USA) käyttökonsentraatio reaktioseoksessa oli 1 M ja sen tarkoituksena oli estää alukkeiden epäspesifistä pariutumista. Templaattipitoisuudet vaihtelivat 20–200 ng/μl. PCR-reaktiot suoritettiin Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA) PCR-laitteella. Ajo-olosuhteet olivat +94 °C 1 minuutti, +45 °C 2 minuuttia ja +72 °C 2 minuuttia yhteensä 30 sykliä, jonka jälkeen +72 °C 10 minuuttia. Positiivisena kontrollina käytettiin *Y. enterocolitica* O:3 FE80704 kantaa. Näytteet säilöttiin ajon jälkeen jääkaappiin (+4 °C) odottamaan agarosigeelielektroforeesia.

3.3.3 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesissa käytettiin ajopuskurina 0,5 x TBE:tä ja 1 % agarosigeliä (SeaKem® ME agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Rockland, ME USA), jota valmistettiin 100 ml per geeli 0,5 x TBE:hen. PCR-tuotteesta pipetoitiin 7 μl:n näyte johon lisättiin 1,5 μl 6 x näytopuskuria (Fermentas, Vilna, Liettua). Molekyylipainostandardina oli Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Vilna, Liettua), jota pipetoitiin kaivoon 6 μl. Näytteet ajettiin sisään geeliin noin 5 minuuttia 100 V, jonka jälkeen jännite nostettiin 120 V ja ajoa jatkettiin vielä noin tunnin verran. Virtalähteenä toimi Pharmacia LKB GPS 200/400 (Biotechnology AB, Uppsala, Ruotsi) ja ajolaitteena Horizon 11.14 GIBGO BRL (Life technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA). Geelin ajaututtua se värjättiin 0,5 μg/ml etidiumbromidiliuoksessa noin 20 minuuttia ja huuhdeltiin vedessä noin 5 minuuttia. Geeli kuvattiin UV-valossa.

3.4 *yst*-geenien sekvensointi

Yhteensä 32 *yst*-positiivista PCR-näytettä tutkittiin edelleen sekvensoimalla. Näytteistä 30 oli *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kliinisiä kantoja ja kaksi *Y. bercovieri*-kantoja.

yst-geenin PCR-reaktiotuotteet konsentroidiin ja puhdistettiin alukkeista sekä ylimääräisistä nukleotideista Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) kitillä. Menetelmä perustuu näytteen suodattamiseen membraanin läpi ja halutun DNA:n keräämiseen membraanista puhdistettuna. Tämän jälkeen suoritettiin syklinen sekvensointireaktio ABi Prism® DigDye terminator v1.1 -kittiä

(Applied Biosystems, Warrington, Iso-Britannia) käyttäen. Alukkeina käytettiin samoja oligonukleotideja kuin toksiinigeeni PCR-tutkimuksessa (ks. edellä), mutta laimennettuna 1:10 ja vain yhtä aluketta per reaktio. Reaktio tehtiin 1 x DigDye-puskuriin kokonaistilavuuteen 10 µl. DigDye terminator ReadyReaction Mix -entsyymiseosta käytettiin 1 µl, alukekonsentraatio oli 350 nM ja templaattina oli 1 µl puhdistettua PCR-reaktiotuotetta. Syklinen sekvensointireaktio tehtiin Peltier Thermal Cycler PTC 200 PCR-laitteella. Ohjelma oli +96 °C 2 minuuttia, jonka jälkeen +96 °C 10 sekuntia, +50 °C 5 sekuntia ja +60 °C 4 minuuttia yhteensä 25 sykliä. Tämän jälkeen sekvensointireaktio saostettiin pipetoimalla PCR-putkeen 2 µl 3 M natriumasetaattia ja 50 µl 96 % etanolia ja inkuboimalla putkia huoneenlämmössä 15 minuuttia. Putket fuugattiin 5 minuuttia 13 000 x g jonka jälkeen supernatantti pipetoitiin pois. Pelletti pestiin 250 µl:lla 70 % etanolia ja sentrifugoitiin uudestaan 5 minuuttia 13 000 x g. Supernatantti pipetoitiin pois ja pelletti kuivattiin +90 °C lämpöblokkissa yksi minuutti korkki auki. Sekvensointiajota varten pelletin päälle lisättiin 20 µl Hi-Di-formamidi liuosta (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), johon pelletti liuotettiin sekoittaen ja seos siirrettiin sekvensointiputkeen. Sekvensointi suoritettiin ABI Prism 310 Genetic Analyzer-laitteella (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sekvenssit tarkastettiin aluksi BioEdit (Hall, 1999) ohjelmalla, jonka jälkeen ne rinnastettiin BioNumerics-ohjelmalla. Sekvenssejä verrattiin Yhdysvaltojen biotekniikan informaatiokeskuksen NCBI:n (National Center for Biotechnology Information) genomitietokannasta haettuihin *Y. enterocolitica* yst-toksiinigeenien sekvensseihin (<http://www.ncbi.nih.gov/pvm>).

3.5 Potilaskyselyt

Yersinia-tutkimuksen aikana kaikille yersiniainfektion sairastaneille sekä verrokkiryhmälle tehtiin tapaus-verrokkitutkimus KTL:n infektioepidemiologian osastolla. Potilaille lähetettiin kyselykaavake, jossa tiedusteltiin muun muassa infektion aiheuttamia oireita. Potilaita pyydettiin vastaamaan kyllä, ei tai ei tietoa jokaisen kysytyn oireen osalta. Olen tässä tutkimuksessani käyttänyt tietoja potilaiden vatsakivun, ripulin, oksentelun, kuumeen ja verisen ulosteen osalta. Kyselytutkimukseen vastanneiden oiretietoja verrattiin tämän tutkimuksen mikrobiologisiin tuloksiin.

4 TULOKSET

4.1 PFGE tulokset

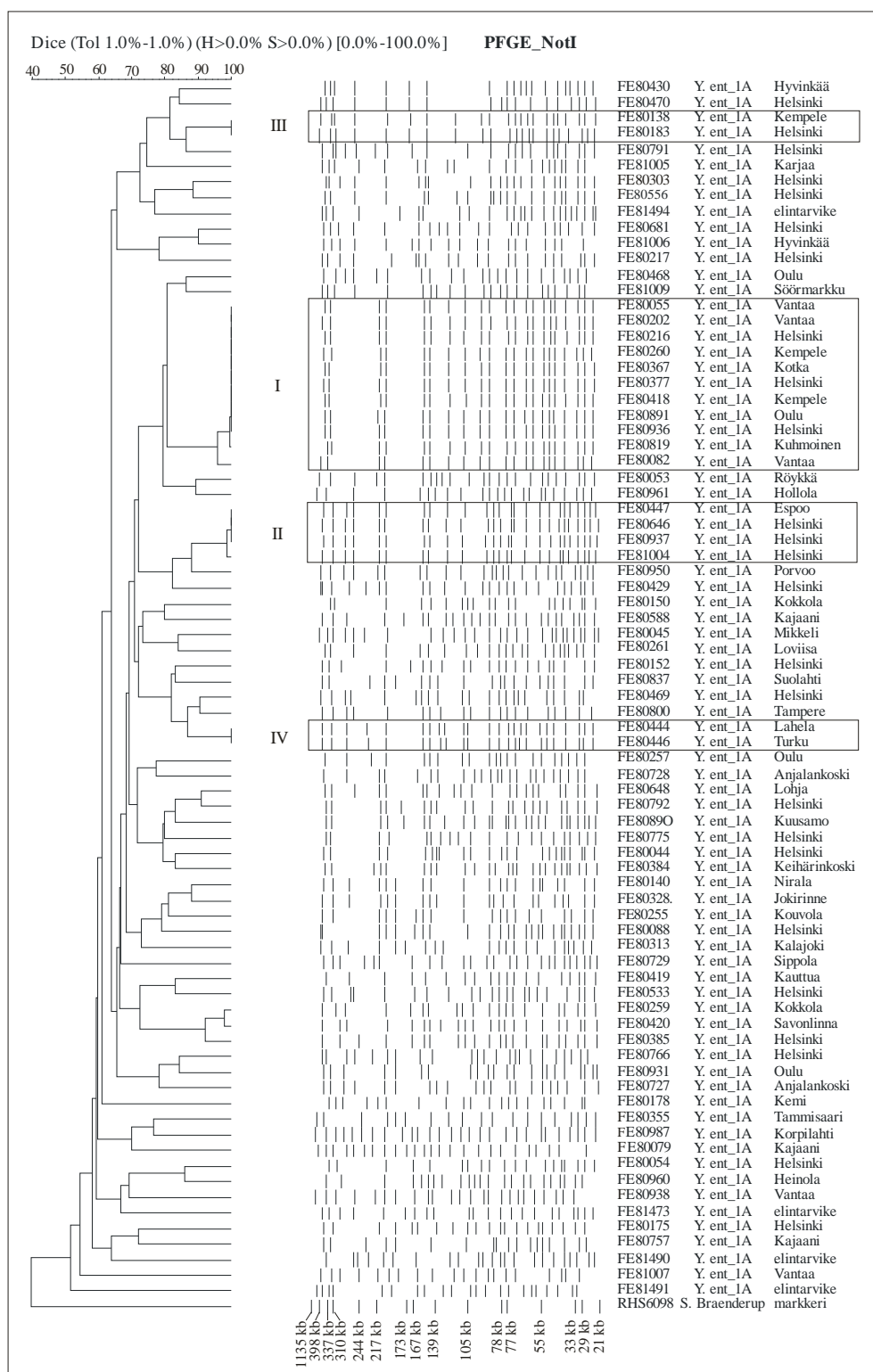
4.1.1 Restriktioentsyymien valinta

Ennen PFGE-tyypitysten aloittamista testattiin *NotI* ja *XbaI* restriktioentsyymien soveltuvuutta tutkimuksen *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen profilointiin kyseisellä menetelmällä. Kaksi kantaa tyypitettiin molemmilla entsyymeillä samoilla ajo-olosuhteilla. Testin tuloksista ilmeni *NotI* restriktioentsyymien hiukan parempi erottelukyky otettaessa huomioon syntyneiden profiilien selkeys ja analysoitavuus.

4.1.2 *Y. enterocolitica* biotyypin 1A PFGE-tyypit

Kaikki tutkimuksen 80 *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantaa tutkittiin PFGE:n avulla *NotI* restriktioentsyymiä käyttäen. Kannoista neljä oli eristetty erilaisista salaateista ja loput olivat ihmisten ulostenäytteistä eristettyjä kliinisiä kantoja. Kaksi ihmisistä eristetyistä kannoista ei tyypittynyt ilmeisesti DNAasin vaikutuksesta. PFGE-ajojen tuloksista ilmeni *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen suuri geneettinen monimuotoisuus (Kuva 3). Yhteensä ilmeni 62 eri PFGE-tyyppiä. Neljä erikokoista samankaltaisten profiilien muodostamaa ryhmää tai paria oli havaittavissa (Kuva 3).

Suurin samanlaisten PFGE-profiilien muodostama ryhmä koostui 11 kannan profiilista, jotka olivat lähes 95 % samankaltaisia (Kuva 3, I). Kannat olivat ihmisten ulosteista eristettyjä kantoja. Helsingissä tai Vantaalla oli eristetty kuusi kantaa, Oulussa tai Kempeleellä kolme kantaa ja loput kaksi muualla Suomessa. Potilaat olivat kolmea yli 70 -vuotiaista lukuun ottamatta 24–60 -vuotiaita. Kannoista kuusi oli eristetty tammikuun aikana ja loput viisi helmi-maaliskuun aikana. Toinen samanlaisten profiilien ryhmä koostui neljästä kliinisestä kannasta, joiden profiilit olivat yli 95 % samanlaisia (Kuva 3, II). Kannoista kolme oli eristetty Helsingissä ja yksi Espoossa. Potilaat olivat 51–61-vuotiaita lukuun ottamatta yhtä yli 80 -vuotiaista.



Kuva 3: *Y. enterocolitica* biotyyppi 1A kantojen PFGE-profiilien vertailu (BioNumerics, DICE korrelaatio). Kuvasta ilmenee kantojen PFGE-tyyppien heterogeeninen luonne sekä samanlaisten PFGE-tyyppien muodostamat ryhmät (I ja II) ja parit (III ja IV). Oikealla potilaiden kotikunta/elintarvikeperäisyys. Alinna molekyylipainostandardina käytetty *S. Braenderup* RHS 6098 kokojakauma.

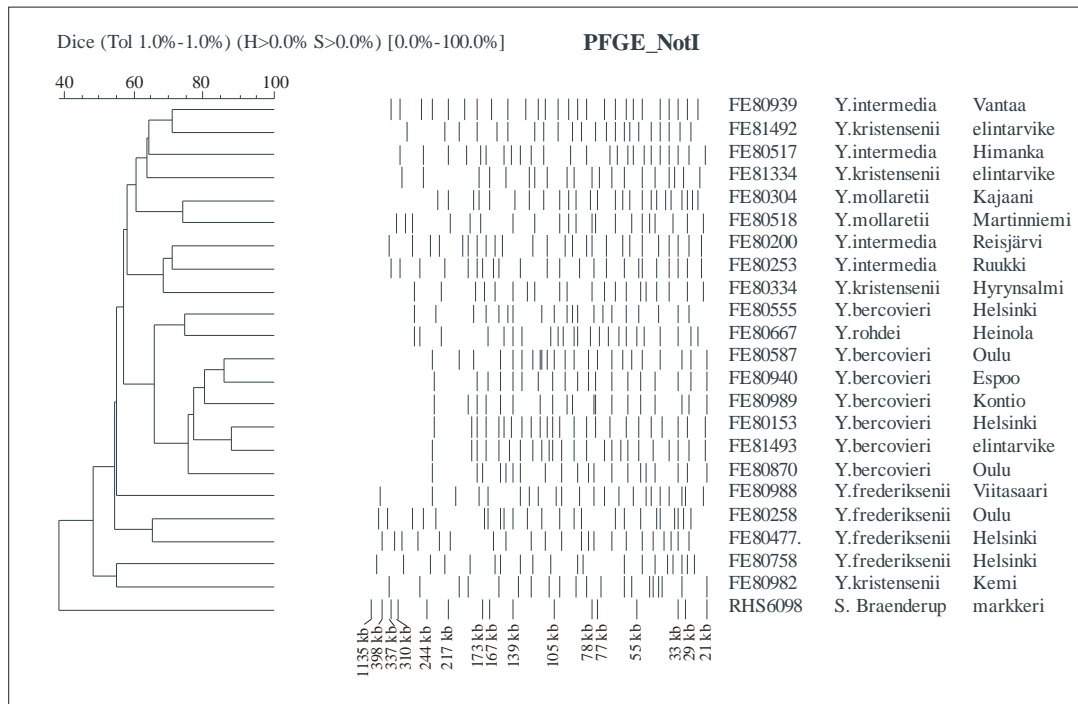
Kannat oli eristetty helmikuun lopun ja huhtikuun alun välisenä aikana. Näiden lisäksi ilmeni kaksi kahden identtisen PFGE-profiilin muodostamaa paria (Kuva 3, III ja IV). Toisen parin kannat oli eristetty Helsingissä ja Kempeleellä tammikuun aikana ja toisen Tuusulassa ja Turussa helmikuun loppupuolella.

Salaateista eristetyt *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannat olivat kaikki PFGE-profiililtaan erilaisia (Kuva 3). Kantojen profiilit erosivat BioNumerics-ohjelmalla analysoituna myös kliinisten kantojen profiileista eivätkä ne liittyneet samankaltaisten profiilien muodostamiin ryhmiin. Ne eivät myöskään olleet keskimäärin samanlaisempia keskenään kuin kliiniset kannat.

4.1.3 *Y. enterocolitica* kaltaisten kantojen PFGE-tyypit

Kaikki 25 *Y. enterocolitica* kaltaista kantaa tutkittiin PFGE:n avulla. Ihmisistä eristetyistä *Y. bercovieri* kannoista 1/8 ja *Y. frederiksenii* kannoista 2/6 ei tyypittynyt käytetyllä menetelmällä luultavasti DNAasin vaikutuksesta. Sen sijaan kaikki muut 19 ihmisistä eristettyä kantaa ja kaikki kolme elintarvikekantaa tyypittyivät.

Y. enterocolitica kaltaisten kantojen PFGE-profiilit olivat keskenään 50 % samanlaisia (Kuva 4). Täysin identtisiä PFGE-profiileja ei ilmennyt, mutta jonkin asteista ryhmittymistä eri lajien mukaan oli havaittavissa. *Y. bercovieri*-kantojen PFGE-tyypit erottuivat silmämääräisesti muiden lajien profiileista ja olivat yli 75 % samanlaisia keskenään, lukuun ottamatta yhtä *Y. bercovieri*-kantaa, joka ryhmittyi tutkimuksen ainoan *Y. rohdei*-kannan kanssa. Tutkimuksessa mukana ollut elintarvikkeista eristetty *Y. bercovieri*-kanta ryhmittyi muiden saman lajin edustajien joukkoon. Elintarvikkeista eristettyjen *Y. kristensenii*-kantojen PFGE-profiilit ryhmittyivät *Y. intermedia*-kantojen kanssa samoin kuin toisen kliinisen *Y. kristensenii*-kannan PFGE-profiili. Molempien tutkimuksessa mukana olleiden *Y. mollaretii*-kantojen PFGE-profiilit olivat lähes 75 % samanlaisia. *Y. frederiksenii* kannat ryhmittyivät vierekkäin, mutta keskinäinen samankaltaisuus jäi alle 50 %.



Kuva 4: *Y. enterocolitica* kaltaisten kantojen PFGE-profiilien vertailu (BioNumerics, DICE korrelaatio). Kuvasta ilmenee jonkin asteista ryhmittymistä eri lajien mukaan. Oikealla potilaiden kotikunta/ elintarvikeperäisyys. Alinna molekyylipainostandardina käytetty *S. Braenderup* RHS 6098 kokojakauma.

4.2 *yst*-geenien esiintyminen yersinioissa

4.2.1 *Y. enterocolitica* biotyyppi 1A

Kaikkiaan 58 kliinisestä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannasta tutkittiin PCR menetelmällä kromosomaalisen *yst*-toksiinigeenin läsnäolo (Taulukko 5). Kannoista 52 (90 %) osoittautui selvästi *yst*-toksiinigeeni positiiviseksi. Heikon positiivisen tuloksen antoi lisäksi kolme kantaa. Tutkituista kannoista vain kolme oli selvästi negatiivisia.

4.2.2 *Y. enterocolitica* kaltaiset kannat

Yhteensä 12 *Y. enterocolitica* kaltaisesta kannasta tutkittiin *yst*-toksiinigeenin läsnäolo (Taulukko 6). Kolme *Y. bercovieri*-kantaa antoi heikon positiivisen tuloksen. Kaikki muut tutkitut kannat olivat selvästi negatiivisia.

Taulukko 5: *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen yst-PCR -tulokset ja sekvensoidut näytteet

| tutk. nro. | kanta-nro. | yst-PCR-tulos | yst-geenin sekvensointi | tutk. nro. | kanta-nro. | yst-PCR-tulos | yst-geenin sekvensointi |
|------------|------------|---------------|-------------------------|------------|------------|---------------|-------------------------|
| 1 | FE80044 | + | X | 30 | FE80377 | + | X |
| 2 | FE80045 | + | X | 31 | FE80335 | - | es |
| 3 | FE80053 | + | X | 32 | FE80384 | + | X |
| 4 | FE80079 | + | X | 33 | FE80385 | + | X |
| 5 | FE80082 | + | X | 34 | FE80420 | + | es |
| 6 | FE80088 | + | X | 35 | FE80419 | + | X |
| 7 | FE80055 | + | X | 36 | FE80418 | + | X |
| 8 | FE80054 | + | X | 37 | FE80429 | + | es |
| 9 | FE80138 | + | X | 38 | FE80430 | + | es |
| 10 | FE80140 | + | X | 39 | FE80444 | + | es |
| 11 | FE80150 | + | X | 40 | FE80447 | + | es |
| 12 | FE80152 | + | X | 41 | FE80446 | + | es |
| 13 | FE80175 | + | X | 42 | FE80468 | + | es |
| 14 | FE80178 | (+) | es | 43 | FE80469 | + | es |
| 15 | FE80183 | + | es | 44 | FE80470 | + | es |
| 16 | FE80202 | + | X | 45 | FE80533 | + | X |
| 17 | FE80216 | + | X | 46 | FE80556 | + | X |
| 18 | FE80217 | + | X | 48 | FE80647 | - | es |
| 19 | FE80255 | + | X | 49 | FE80648 | (+) | X |
| 20 | FE80257 | (+) | es | 50 | FE80646 | + | X |
| 21 | FE80259 | + | es | 51 | FE80728 | + | es |
| 22 | FE80260 | + | es | 52 | FE80729 | + | es |
| 23 | FE80261 | + | X | 53 | FE80727 | + | es |
| 24 | FE80287 | + | es | 54 | FE80757 | + | es |
| 25 | FE80328 | + | es | 55 | FE80766 | + | es |
| 26 | FE80367 | + | X | 56 | FE80775 | - | es |
| 27 | FE80313 | + | es | 57 | FE80791 | + | es |
| 28 | FE80303 | + | es | 58 | FE80792 | + | es |
| 29 | FE80355 | + | X | 60 | FE80819 | + | X |

+: positiivinen, -: negatiivinen, (+): heikko positiivinen, X: sekvensoitu, es: ei sekvensoitu

Taulukko 6: *Y. enterocolitica* kaltaisten kantojen yst-PCR -tulokset ja sekvensoidut näytteet

| tutk. nro. | laji | kanta-nro. | yst-PCR-tulos | yst-geenin sekvensointi |
|------------|-------------------------|------------|---------------|-------------------------|
| 83 | <i>Y. intermedia</i> | FE80200 | - | es |
| 84 | <i>Y. frederiksenii</i> | FE80151 | - | es |
| 85 | <i>Y. intermedia</i> | FE80253 | - | es |
| 86 | <i>Y. frederiksenii</i> | FE80258 | - | es |
| 87 | <i>Y. mollaretii</i> | FE80304 | - | es |
| 88 | <i>Y. kristensenii</i> | FE80334 | - | es |
| 89 | <i>Y. bercovieri</i> | FE80392 | (+) | es |
| 93 | <i>Y. bercovieri</i> | FE80555 | (+) | X |
| 94 | <i>Y. bercovieri</i> | FE80587 | (+) | X |
| 98 | <i>Y. bercovieri</i> | FE80870 | - | es |
| 100 | <i>Y. frederiksenii</i> | FE80860 | - | es |
| 103 | <i>Y. intermedia</i> | FE80939 | - | es |

+: positiivinen, (+): heikko positiivinen, X: sekvensoitu, es: ei sekvensoitu

4.3 *yst*-geenien nukleotidisekvenssit

Yhteensä 32 *yst*-positiivista PCR-näytettä tutkittiin edelleen sekvensoimalla. Näytteistä 30 oli *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kliinisiä kantoja (Taulukko 5). Saatujen sekvenssien laatu ja pituus vaihtelivat suuresti. Nukleotidisekvenssejä vertailtaessa havaittiin kaikkien tutkimuksessa mukana olleiden *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen toksiinigeenisekvenssien olevan lähes identtisiä keskenään niiltä osin kun ne olivat onnistuneet. Vertailtaessa tutkimuksessa saatuja lähes koko toksiinigeenin kattavia sekvenssejä yhteen genomitietokannasta haettuun *Y. enterocolitican ystB*-toksiinigeenin sekvenssiin (D88145) havaittiin vain yksittäisten emästen eroja. Erot nukleotidisekvenssissä aiheuttivat eroavaisuuksia signaalipeptidin ja pre-domeenin aminohapposekvenssiin, mutta varsinaisen toksiinin aminohapposekvenssiin ne eivät vaikuttaneet (kuva 5). Signaalipeptidin osalta muutokset olivat isoleusiinista valiiniksi (aminohappo 5) ja alaniinista valiiniksi (aminohappo7). Pre-domeenin aminohapposekvenssissä glutamaatti (aminohappo 21) oli tutkimuksen kannoilla glutamiini. Toisaalta yksittäiset erot nukleinihapposekvenssissä voivat kuitenkin osaltaan selittyä myös sekvensoinnin epätarkkuudesta.

Näytteistä kaksi oli positiivisen tuloksen *yst*-toksiinigeeni kartoituksessa antaneita *Y. bercovieri*-kantoja (Taulukko 6). Näiden kahden *Y. bercovieri*-kannan sekvenssit olivat keskenään hyvin samanlaisia niiltä osin kun ne olivat onnistuneet, mutta erosivat genomitietokannasta haetuista toksiinigeenisekvensseistä selvästi. Kuitenkin varsinaisen toksiinin osalta sekvensseissä oli selviä yhtäläisyyksiä muiden toksiinigeenien kanssa (Kuva 6). Aminohapposekvenssit osoittautuivatkin 14 viimeisen aminohapon osalta täysin identtisiksi. Tämä on ensimmäinen kerta kun *Y. bercovieri*-kannoilta on löydetty enterotoksiinigeenihomologi.

| | | | | | | | | | |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | M | K | K | I | I | L | A | L | V |
| YstB: | A T G | A A A | A A G | A T A | A T T | T T G | G C T | C T G | G T A |
| 80533: | - - - | A A A | A A G | A T A | A T T | T T N | G T T | C T G | G T A |
| | - | K | K | I | V | X | V | L | V |
| | L | M | L | F | S | F | C | T | L |
| YstB: | T T A | A T G | C T G | T T T | T C A | T T T | T G T | A C A | T T A |
| 80533: | T T A | A T G | C T G | T T T | T C A | T T T | T G T | A C A | T T A |
| | L | M | L | F | S | F | C | T | L |
| | G | Q | E | T | A | S | M | H | L |
| YstB: | G G C | C A A | G A G | A C G | G C T | T C A | A T G | C A T | C T T |
| 80533: | G G C | C A A | C A G | A C G | G C T | T C A | A T G | C A T | C T T |
| | G | Q | Q | T | A | S | M | H | L |
| | D | D | T | L | S | A | P | I | A |
| YstB: | G A T | G A T | A C A | T T A | T C G | G C A | C C A | A T A | G C C |
| 80533: | G A T | G A T | A C A | T T A | T C G | G C A | C C A | A T A | G C C |
| | D | D | T | L | S | A | P | I | A |
| | A | E | I | N | R | K | A | C | D |
| YstB: | G C T | G A G | A T A | A A C | A G A | A A A | G C G | T G C | G A T |
| 80533: | G C T | G A G | A T A | A A C | A G A | A A A | G C G | T G C | G A T |
| | A | E | I | N | R | K | A | C | D |
| | T | Q | T | P | S | P | S | E | E |
| YstB: | A C T | C A G | A C C | C C A | T C G | C C T | T C A | G A A | G A A |
| 80533: | A C T | C A G | A C C | C C A | T C G | C C T | T C A | G A A | G A A |
| | T | Q | T | P | S | P | S | E | E |
| | N | D | D | W | C | C | E | V | C |
| YstB: | A A T | G A T | G A T | T G G | T G T | T G T | G A G | G T A | T G T |
| 80533: | A A T | G A T | G A T | T G G | T G T | T G T | G A G | G T A | T G T |
| | N | D | D | W | C | C | E | V | C |
| | C | N | P | A | C | A | G | C | * |
| YstB: | T G C | A A T | C C T | G C C | T G T | G C G | G G T | T G C | T A G |
| 80533: | T G C | A A T | C C T | G C C | T G T | G C T | G G C | T G C | T A G |
| | C | N | P | A | C | A | G | C | * |

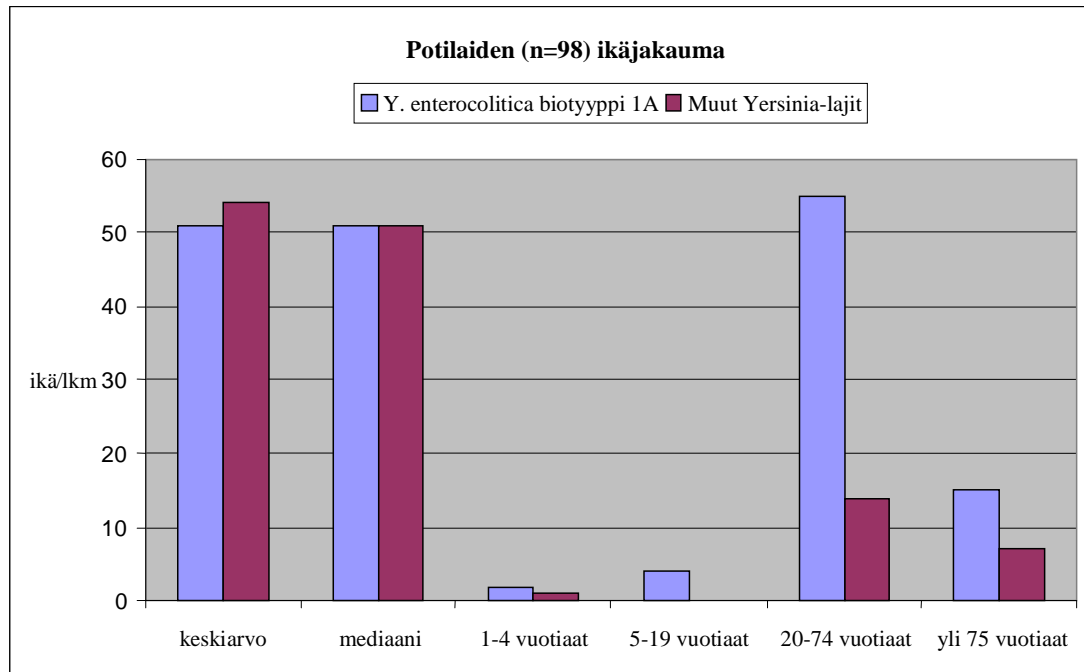
Kuva 5: Erot genomitietokannasta haetun *ystB*-toksiinigeenin (D88145) ja tutkimuksessa mukana olleen *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannan FE80533 toksiinigeenin nukleotidi (keskirivit)- ja aminohapposekvenssien (ylä- ja alarivit) välillä. Erot nukleotidisekvenssissä tummalla pohjalla ja erot aminohapposekvenssissä vahvennettu (aminohapot 5, 7, 21). Varsinaisen toksiinin alku merkattu nuolella.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| YstA: | C | A | A | G | C | T | T | G | T | G | A | T | C | C | T | C | C | G | T | C | G | C | C | A | C | C |
| YstB: | A | A | A | G | C | G | T | G | C | G | A | T | A | C | T | C | A | G | A | C | C | C | C | A | T | C |
| YstC: | G | C | T | G | A | G | T | G | C | G | G | T | A | C | T | C | A | G | T | C | A | G | C | A | A | C |
| Ykst: | A | A | A | G | C | T | T | G | C | G | A | T | A | C | T | G | A | A | T | T | G | C | C | G | - | C |
| 80555: | C | G | A | G | - | T | T | G | C | G | A | T | A | - | T | G | A | A | T | T | A | C | C | G | C | |
| 80587: | C | G | A | G | - | T | T | G | C | G | A | T | A | - | T | T | A | A | T | T | A | C | C | G | C | |
| YstA: | A | G | C | C | G | A | A | G | T | C | A | G | T | A | G | T | G | A | T | T | G | G | - | G | A | T |
| YstB: | G | C | C | T | T | C | A | G | A | A | G | A | A | A | A | T | G | A | T | - | - | - | - | G | A | T |
| YstC: | A | A | C | C | A | A | G | G | C | G | A | A | A | A | T | G | A | T | T | G | G | - | G | A | T | |
| Ykst: | - | - | C | C | T | - | - | - | C | - | - | - | - | - | T | - | - | - | - | - | - | - | - | G | A | T |
| 80555: | C | A | C | T | T | T | T | G | - | - | G | A | A | A | C | A | G | A | T | T | A | T | C | G | A | C |
| 80587: | C | A | C | T | T | T | T | G | - | - | G | A | A | A | C | C | G | A | T | T | A | T | C | G | A | C |
| YstA: | - | - | - | T | G | C | T | G | T | G | A | T | G | T | A | T | G | T | T | G | C | A | A | T | C | C |
| YstB: | T | G | G | T | G | T | T | G | T | G | A | G | G | T | A | T | G | T | T | G | C | A | A | T | C | C |
| YstC: | T | G | G | T | G | C | T | G | T | G | A | G | T | T | A | T | G | T | T | G | C | A | A | T | C | C |
| Ykst: | T | G | G | T | G | C | T | G | T | G | A | G | G | T | A | T | G | C | T | G | C | A | A | T | C | C |
| 80555: | T | G | G | T | G | C | T | G | T | G | A | G | C | T | A | T | G | T | T | G | C | A | A | T | C | C |
| 80587: | T | G | G | T | G | C | T | G | T | G | A | G | C | T | A | T | G | T | T | G | C | A | A | T | C | C |
| YstA: | C | G | C | G | T | G | T | G | C | T | G | G | C | T | G | C | T | A | G | | | | | | | |
| YstB: | T | G | C | C | T | G | T | G | C | G | G | G | T | T | G | C | T | A | G | | | | | | | |
| YstC: | T | G | C | T | T | G | T | T | T | G | G | T | T | G | C | T | A | A | | | | | | | | |
| Ykst: | C | G | C | G | T | G | T | G | C | T | G | G | C | T | G | C | T | A | G | | | | | | | |
| 80555: | G | G | C | C | T | G | T | G | C | T | G | G | C | T | G | C | T | A | G | | | | | | | |
| 80587: | G | G | C | C | T | G | T | G | C | T | G | G | C | - | - | - | - | - | | | | | | | | |

Kuva 6: Erot geenipankista haettujen *yst*-toksiinigeenien ja tutkimuksessa mukana olleiden *Y. bercovieri* kantojen FE80555 ja FE80587 varsinaisten toksinien nukleotidisekvenssien välillä. Eroavat ja ylimääräiset nukleiinihapot sekä ylimääräiset välit tummalla pohjalla.

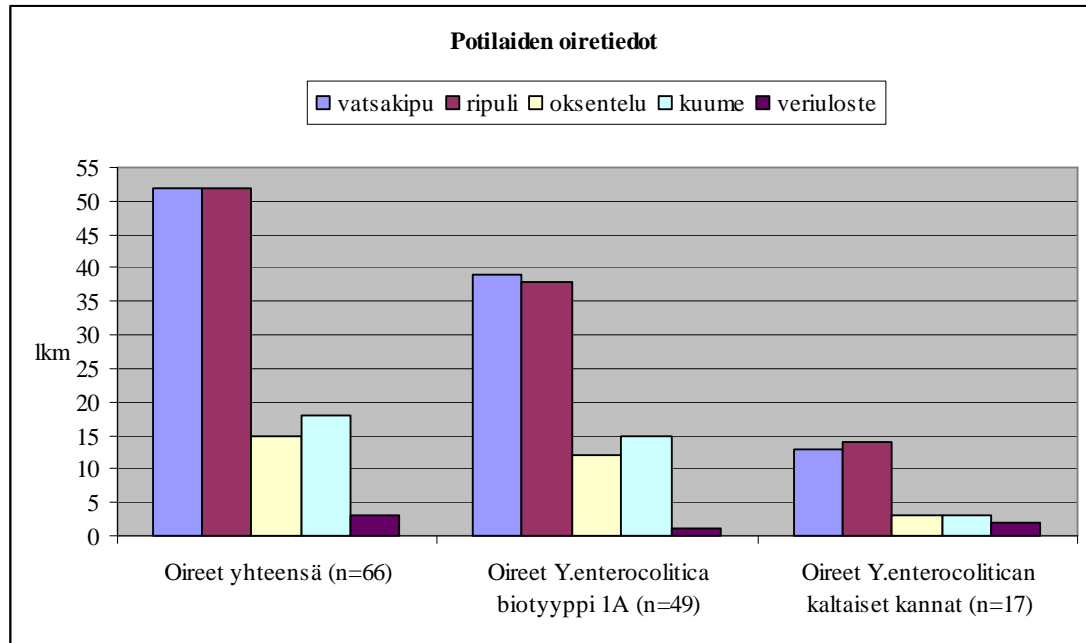
4.4 Potilaiden ikä- ja oirejakauma

Potilaiden joiden ulostenäytteestä löytyi *Y. enterocolitica* biotyypin 1A, keskimääräinen ikä sairastumishetkellä oli noin 51 vuotta ja mediaani 51. *Y. enterocolitican* kaltaisilla kannoilla keski-ikä oli noin 54 vuotta ja mediaani 51 (Kuvaaja 1). Tutkimuksessa mukana olleista potilaista 57 % (56/98) oli naisia. Alle nelivuotiaita oli sairastuneista yhteensä kolme, joista kahdelta oli eristetty *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kanta ja yhdeltä *Y. frederiksenii*-kanta. Yli 75 -vuotiaita sairastuneita oli yhteensä 22 ja löydöksistä 15 oli *Y. enterocolitica* biotyyppiä 1A.



Kuvaaja 1: Potilaiden ikäjakauma

Kyselytutkimuksessa potilailta tiedusteltiin yersinialöydökseen liittyen mahdollisesta vatsakivusta, ripulista, oksentelusta, kuumeesta ja verisestä ulosteesta. Tässä tutkimuksessa mukana olleesta 98 potilaasta kyselytutkimukseen vastasi yhteensä 66 potilasta (67 %). Yli 75-vuotiaista 59 % (13/22) ja 20–74 -vuotiaista 23 % (16/69) jätti vastaamatta kyselytutkimukseen. Vastanneista 63:lla (95 %) oli ilmennyt ainakin yksi kysytyistä oireista. Yleisimmät oireet olivat vatsakipu ja ripuli, josta kummastakin kärsi yhteensä 52 (79 %) potilasta. Kuumeesta kärsi 18 (27 %) potilasta ja oksentelusta 15 (23 %) potilasta. Veristä ulostetta ilmeni kolmella potilaalla, joista yhdeltä oli eristetty *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kanta, toiselta *Y. bercovieri*- ja kolmannelta *Y. frederiksenii* -kanta. Potilaat olivat 64, 23 ja 79 -vuotiaita ja tapauksiin ei liittynyt toista löydöstä. Yleisin ainoa oire oli vatsakipu (7 potilasta), mutta lähes yhtä paljon kärsittiin ripulista (6 potilasta) ilman muita oireita. Vähintään kahdesta oireesta oli kärsinyt 48 potilasta ja yleisimmät näistä olivat vatsakipu ja ripuli. Kaikista tiedustelluista oireista oli kärsinyt yksi potilas ja samoin yksi kyselytutkimukseen vastannut ei ollut kärsinyt mistään kysytystä oireesta. Merkittäviä eroja *Y. enterocolitica* biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen aiheuttamien oireiden välillä ei ilmennyt (Kuvaaja 2).



Kuvaaja 2: Potilaiden oirejakauma. Yhdellä potilaalla ei ilmennyt kysytyjä oireita ja yhden potilaan oireista ei ole tietoa.

5 TULOSTEN TARKASTELU

5.1 Kantojen monimuotoisuus

Tutkimuksessani suomalaisten *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen geneettistä monimuotoisuutta tarkasteltiin PFGE:n avulla ensimmäistä kertaa. Saadut PFGE-tyyppitytulokset olivat osoitus suuresta genotyypisestä vaihtelusta ja olivat samansuuntaisia kuin muualla maailmassa tehdyissä tutkimuksissa. Biotyyppin 1A -kantojen heterogeenisyys on ilmennyt PFGE-tyyppityksissä muun muassa ranskalaisissa (Najdenski ym., 1994; Iteman ym., 1996) sekä brasilialaisissa (Falcao ym., 2006) tutkimuksissa. Myös muilla menetelmillä, kuten AFLP:llä on saatu samansuuntaisia tuloksia ihmisistä ja eläimistä eristettyjen *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen geneettisestä heterogeenisuudesta (Fearnley ym., 2005; Kuehni-Boghenbor ym., 2006). Myös geenisirutekniikalla suoritettussa kokogenomivertailussa *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannat ovat paljastuneet patogeeneisiin serotyyppeihin kuuluvia lajitovereitaan heterogeenisemmäksi ryhmäksi (Howard ym., 2006).

Tutkimuksissa saman *Y. pestis*-kannan eri pesäkkeistä eristetyistä DNA:sta on saatu toisistaan poikkeavia PFGE-tyyppejä (Guiyoule ym., 1994). Muiden tutkimusten mukaan ainakin patogeenisten *Y. enterocolitica*-kantojen genomi on kuitenkin *in vitro* stabiilimpi kuin *Y. pestis*-kantojen, vaikka geneettistä monimuotoisuutta saattaa esiintyä *in vivo* (Najdenski ym., 1994). Genomin epävakautta *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilla ei ole tutkittu, mutta se saattaisi selittää kantojen PFGE-tyyppien heterogeenisuutta. Toisaalta, *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannat ovat levinneet laajalti erilaisiin kasvuympäristöihin, ja ovat mahdollisesti vain erilaistuneet tehokkaasti aikojen kuluessa, mikä selittäisi kantojen heterogeenisen luonteen.

Heterogeenisuuden lisäksi, tutkimuksessani löytyi myös erikokoisia, lähes samanlaisten tai identtisten PFGE-profiilien ryppäitä ja pareja. Samanlaisten PFGE-tyyppien ryppäisiin ja pareihin liittyneet kannat olivat työ- ja eläkeikäisistä ihmisistä eristettyjä, jakautuivat ajallisesti muutaman kuukauden ajalle sekä eri puolelta Suomea. Kuitenkin suurimmassa ryppäessä (11 kantaa) oli selvästi enemmän kantoja Helsingin ja Oulun seuduilta ja toiseksi

suurimmassa (4 kantaa) kaikki kannat olivat Helsingistä tai Espoosta. Ilmiö on mielenkiintoinen ja viittaa mahdolliseen maantieteelliseen yhteyteen tartuntalähteessä, *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen PFGE-tyyppien yleisen heterogeenisyyden takia. Yersiniabakteereilla ihmisestä toiseen tapahtuva leviäminen on epätodennäköistä tarvittavan infektiivisen annoksen suuruuden vuoksi, mikä myös puhuisi yhteisen tartuntalähteen puolesta. Samanlaisten PFGE-tyyppien muodostamilla kannoilla saattaisi olla ominaisuuksia, jotka vaikuttavat niiden patogeenisuuteen tai ainakin mekanismeja, joiden avulla ne pystyvät aiheuttamaan tällaisia ryppäitä. Vastaavanlaisia, ihmisistä eristettyjen *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen muodostamia keskenään varsin samanlaisia PFGE-tyyppejä on löydetty myös aiemmin. Najdenski ym. (1994) tutkivat 16 *Y. enterocolitica* serotyypin O:5, biotyypin 1A kantaa *NotI* restriktioentsyymillä ja saivat 14 erilaista PFGE-tyyppiä, kolmen kannan ollessa lähes samanlaisia keskenään.

Tässä tutkimuksessa oli mukana vain neljä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A elintarvikekantaa. Ne olivat PFGE-tyypeiltään kaikki erilaisia keskenään ja vertailtaessa ihmisistä eristettyjen kantojen PFGE-tyyppeihin. Vaikka kannat oli eristetty salaateista vanhainkodeissa, joissa ripulipotilaiden ulostenäytteistä oli todettu *Y. enterocolitica* biotyyppiä 1A, eivät salaatit olleet samaa erää, raaka-ainetta tai välttämättä edes samalta toimittajalta, kun ne joita sairastuneet olivat syöneet. Oireiden välittäjä saattoi myös olla jokin aivan muu elintarvike. Myöskään varmuutta oireiden aiheuttajasta ei saatu. Vihanneksia ja juureksia pidetään ei-patogeenisten kantojen reservoaarina, mikä voisi selittää sen, että keskenään tai potilaskantojen kanssa samanlaisia PFGE-tyyppejä ei elintarvikekannoista löytynyt. Tutkimuksessa mukana olleiden elintarvikekantojen määrä on kuitenkin niin vähäinen, ettei tulosten merkittävyydestä voida sanoa juuri mitään.

Tämän tutkimuksen mukaan *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen PFGE-profiilit erosivat *Y. enterocolitica* biotyypin 1A profiileista. Kahta samanlaista PFGE-tyyppiä ei löytynyt, vaikka jonkin asteista ryhmittymistä lajien mukaan oli havaittavissa. Esimerkiksi tutkimuksen *Y. bercovieri*-kantojen PFGE-tyypit olivat jopa silmämääräisesti erilaisia verrattuna muihin, vaikka lajien väliseksi erottelumenetelmäksi PFGE:stä ei kuitenkaan ehkä olisi. *Y. enterocolitican* kaltaisia kantoja on tutkittu PFGE:n avulla vähän, mutta on kuitenkin todettu, että niiden PFGE-profiilit erottuvat patogeenisten *Y. enterocolitican* vastaavista (Buchrieser ym., 1994). Lisäksi ainakin *Y. bercovieri*-lajin geneettinen heterogeenisuus on paljastunut PFGE- tutkimuksissa aiemmin (Sulakvelidze 2000).

5.2 *yst*-toksiinigeenin esiintyvyyden merkitys

Lähes kaikilta nyt tutkituilta *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilta löytyi kromosomaalinen *yst*-enterotoksiinigeeni. Tulokset ovat yhtäpitäviä muiden tutkimusten kanssa, joissa suurelta osalta *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoista on löytynyt *ystB*-geeni (Grant ym., 1998). Toksiinigeeniä pidetään yersinioiden tärkeänä virulenssitekijänä (Mikulskis ym., 1994). Koska *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilta puuttuvat monet muut virulenssimarkkerit, on enterotoksiinin merkitys näiden kantojen mahdollisen patogeenisuuden aiheuttajana potentiaalinen. Lisäksi *Y. enterocolitica* biotyypin 1A infektiot on yhdistetty ripulin oireisiin (Morris ym., 1991), johon enterotoksiinilla katsotaan olevan suuri merkitys. Tässä tutkimuksessa mukana olleiden, kyselytutkimuksen mukaan oireettoman sekä muista kuin ripulin oireista kärsivien potilaiden näytteistä eristettyjen yersiniakantojen kromosomista löytyi *yst*-geeni ja toisaalta kaikkia kysytyjä oireita kärsineeltä potilaalta eristetystä kannasta ei *yst*-geeniä löytynyt. Toisaalta toksiinigeenin läsnäolo kromosomissa ei välttämättä tarkoita toksiinituotantoa bakteerin infektoissa isäntäänsä (Ramamurthy ym., 1997; Grant ym., 1998). *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen patogeenisuuteen liittyy mahdollisesti myös muita, ehkä vielä tuntemattomia tekijöitä

Y. enterocolitican kaltaisilta kannoilta vain *Y. bercovieri*-lajiin kuuluvilta löytyi toksiinigeenin homologi kromosomista. Aiemmin ei ole raportoitu vastaavasta löydöstä. *Y. bercovieri*-kannoilta on löytynyt toksiiniaktiivisuutta (Sulakvelidze, 1999) ja muilta *Y. enterocolitican* kaltaisilta lajeilta *yst*-geeni homologeja kromosomista (Delor ym., 1990; Kwaga ym., 1992). Kaikilta testatuilta tämän tutkimuksen *Y. bercovieri*-kannoilta ei geeniä kuitenkaan löytynyt. Toisaalta oiretiedot *yst*-geeni positiivisten ja negatiivisten *Y. bercovieri*-kantojen välillä eivät eronneet ja myös näiden kantojen patogeenisuuteen saattaisi liittyä muita tekijöitä. Toksiinia koodittava alue joidenkin *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen kromosomissa saattaa myös olla nukleiinihapposekvenssiltään sen verran erilainen etteivät käyttämämme alukkeet pystyneet kiinnittymään siihen ja jäi näin ollen löytymättä.

5.3 Toksiinigeenin rakenteen tarkastelu

Tutkimuksen aikana tutkittujen 30 *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannan *yst*-geenien sekvenssit olivat hyvin samankaltaisia keskenään ja varsinaisen toksiinin nukleotidisekvenssi oli lähes identtinen ja aminohapposekvenssi täysin identtinen genomitietokannasta haettuun *ystB*-toksiinigeeniin verrattaessa. Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että lämpökestoisen enterotoksiinin nukleotidi- ja aminohapposekvenssi on konservoitunut jopa eri lajien välillä (ks. yleiskatsaus Nair ja Takeda, 1989). Ja yersinialla eri toksiinigeenit ovat varsinkin varsinaisen toksiinin sekvenssin osalta erittäin samankaltaiset (Ramamurthy ym., 1997). Erot kantojen signaalipeptidin aminohapposekvenssissä tämän tutkimuksen kantojen ja genomitietokannasta haetun *ystB*-sekvenssin välillä eivät luultavasti vaikuta proteiinin rakenteeseen, koska sekä isoleusiini että alaniini ja niiden tilalla tutkimuksen kannoissa oleva valiini ovat kemiallisilta ominaisuuksiltaan samankaltaisia muodostaen proteiinien rakennetta tukevia hydrofobisia sidoksia. Pre-domeenin aminohapposekvenssissä glutamaatti oli tutkimuksen kannoilla vaihtunut glutamiiniksi. Glutamaatti on negatiivisesti varautunut aminohappo, joka muodostaa proteiinin rakennetta tukevia suolasiltoja positiivisesti varautuneiden aminohappojen kanssa. Glutamiini on puolestaan polarinen, sähköiseltä varaukseltaan neutraali aminohappo. Kyseinen muutos saattaisi vaikuttaa toksiinin pre-domeenin rakenteeseen ja mahdollisesti toksiinin eritykseen solusta.

Toksiinigeenien sekvensoinnissa saatujen sekvenssien laatu ja pituus vaihtelivat suuresti. Syynä saattoi olla syklisen sekvensointireaktion epäonnistuminen paksumpien reaktioputkien käytön takia. Yli puolella tutkituista *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoista oli kuitenkin lähes täydellinen enterotoksiinigeeni kromosomissaan. Enterotoksiinigeenin läsnäolo kromosomissa ei kuitenkaan välttämättä tarkoita toksiiniaktiivisuutta bakteerin infektoidessa isäntäänsä (Ramamurthy ym., 1997; Grant ym., 1998). Lisätutkimukset toksiiniaktiivisuuden tutkimiseksi toisivat tietoa kantojen patogeenisuudesta ja yhteydestä havaittuihin oireisiin.

Tutkimuksen *Y. bercovieri*-kantojen toksiinisekvenssit erosivat *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen vastaavista. Verrattaessa geenipankista haettuihin yersinia-toksiinigeenisekvensseihin *ystA*, *ystB*, *ystC* ja *ykst*, havaittiin myös eroja. Varsinaisen toksiinin osalta yhtäläisyyksiä kuitenkin löytyi ja viimeiset 14 aminohappoa olivat täysin

identtiset *ystB*-toksiinigeenin kanssa. Näihin 14 aminohappoon sisältyivät myös kuusi kysteiniinitähdettä, jotka ovat välttämättömiä lämpökestoisten enterotoksiinien toksisuudelle ja rakenteen stabiiliudelle (Shimonishi ym., 1987). Kantojen varsinaisen toksiinin nukleotidisekvenssiä kokonaisuutena tutkittaessa havaittiin, että sekvenssien erot vaikuttivat aminohapposekvenssiin ja myös lukuraami oli muuttunut. *Y. bercovieri*-kannoilta siis löytyi enterotoksiinigeenihomologi, mutta onko sen koodittama enterotoksiini toimiva, kaippaa lisätutkimuksia.

5.4 Tutkimuksen tulosten vertailu potilaiden oireisiin

Lähes kaikki kyselytutkimukseen vastanneet olivat kärsineet yhdestä tai useammasta tiedustelluista oireista. Viiden tässä tutkimuksessa mukana olleen kannan näytteestä oli eristetty myös toinen suolistopatogeeni, joka siis voisi osaltaan vaikuttaa mahdollisiin oireisiin. Mitään eroja oiretiedoissa ei kuitenkaan havaittu, tosin oireet voisivat olla hyvin samankaltaisia. Aiempien tutkimuksen mukaan ei-patogeenisina pidetyt *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannat sekä *Y. enterocolitican* kaltaiset kannat aiheuttavat ihmisille jonkin asteisia oireita. Morris ym. (1991) on tutkimuksissaan saanut samansuuntaisia tuloksia eristämällä ripulista kärsiviltä lapsilta *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantoja. Kyseisessä tutkimuksessa kannoilta ei kuitenkaan löydetty toksiinigeeniä hybridisaatiokokeissa, mutta osalla kannoista havaittiin enterotoksiiniaktiivisuutta menetelmällä, jossa mitataan nesteen kertymistä hiirenpoikasen suolistoon (Robins-Browne ym., 1979).

Yhteyttä PFGE-tutkimuksissa ilmenneiden samanlaisten profiilien muodostamien ryhmien ja oiretietojen välillä ei ilmennyt. Samassa ryhmässä saattoi olla kantoja, jotka kyselytutkimuksen mukaan eivät olleet aiheuttaneet mitään oireita sekä useita oireita, mukaan lukien oksentelua tai kuumeilua aiheuttaneita kantoja. Tulokset voisivat tukea käsitystä isännän immuunipuolustuksen osuudesta *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen aiheuttamissa infektioissa (Howard ym., 2006). Tämä voisi osaltaan selittää myös vanhuksilla todettujen oireiden ja *Y. enterocolitica* biotyypin 1A-löydösten yhteyttä varsinkin, kun potilailta ei löydetty perinteisiä ripulinaiheuttajia. Toisaalta tässä tutkimuksessa tiettyä elintarvikkeista eristettyä PFGE-tyyppiä ei pystytty yhdistämään potilaslöydöksiin.

Kyselytutkimuksen mukaan oireet *Y. enterocolitica* biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen aiheuttamien infektioiden välillä eivät juuri eronneet. Tulokset voisivat puhua samankaltaisten virulenssimekanismien toiminnasta kummallakin ryhmällä kantoja. Toisaalta *yst*-toksiinigeeni löytyi lähes kaikilta tutkituilta *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilta, mutta vain murto osalta *Y. enterocolitican* kaltaisia kantoja. Tuloksista voisi päätellä *yst*-toksiinigeenin olevan merkittävä patogeenisuustekijä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilla, mutta silloin *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen aiheuttamiin oireisiin tutkitulla enterotoksiinigeenillä ei olisi merkitystä. Toisaalta sekä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen sekä *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen patogeenisuuteen luultavasti vaikuttaa myös aivan muita tekijöitä. Toksiinigeenin sekvenssin erot eri lajeilla saattavat myös selittää, miksi *Y. enterocolitican* kaltaisilta kannoilta vain *Y. bercovieri*-lajilta löytyi toksiinigeenihomologi tutkimuksessa käytetyillä alukkeilla.

Y. enterocolitica biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen kliinisestä merkitsevyydestä on eriäviä mielipiteitä. Epidemiologinen todistusaineisto merkitsevyyden puolesta on lisääntynyt eri maissa tehtyjen tutkimusten myötä (Burnens ym., 1996; Morris ym., 1991; Bisset ym., 1990; Noble ym., 1987). Kantojen taudinaiheuttamismekanismeja ei kuitenkaan tunneta tarkasti, vaikka myös tässä tutkimuksessa suurelta osalta kannoista löytyi toksiinigeenihomologi. Suomessa suurin osa vuosittain eristetyistä *Y. enterocolitica*-kannoista kuuluu biotyypiin 1A (Suolistobakteerilaboratorion rekisteri, Kansanterveyslaitos). Isännän immuunipuolustuksen vaikutusta kantojen taudinaiheuttamiskykyyn on esitetty (Howard ym., 2006), mikä voisi selittää *Y. enterocolitica* biotyypin 1A infektoita joissain potilasryhmissä. Tässä tutkimuksessa kyselytutkimuksen mukaan lähes kaikilla potilailla, joilta löytyi *Y. enterocolitica* biotyypin 1A tai *Y. enterocolitican* kaltainen kanta aiheuttivat jonkinasteisia oireita potilaille, ja lähes kaikilta biotyypin 1A kannoilta löytyi toksiinigeeni kromosomista. Siten kannoilla mahdollisesti on jonkin asteista kliinistä merkitsevyyttä.

5.5 Jatkotutkimusehdotuksia

Y. enterocolitica biotyypin 1A kantojen PFGE-tutkimuksissa on ongelmana ollut kantojen suuri geneettinen heterogeenisuus, jolloin menetelmä on enemmän yksilöinyt kuin ryhmitellyt kantoja. Vielä harvempaan pilkkovan restriktioentsyymien käyttö PFGE-

tutkimuksissa voisi teoriassa ratkaista ongelman menetelmän silloin ryhmitellessä kannat paremmin. Tällaiset entsyymit ovat kuitenkin harvinaisia ja kalliita sekä siksi vähemmän käytettyjä. Myös muilla molekyylogeneettisillä tyyppitysmenetelmillä, kuten Multilocus sequence typing (MLST)-tekniikalla, joka karakterisoi bakteereja niiden hitaasti muuttuvien housekeeping-geenien nukleotidisekvenssien mukaan, olisi mielenkiintoista tutkia *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantoja menetelmän paremman ryhmittelykyvyn toivossa.

Y. enterocolitica biotyypin 1A kantojen genomien stabiilisuutta ei ole tutkittu. Genomin epästabiilisuus voisi selittää kantojen genomien heterogeenista luonnetta. Genomin stabiilisuutta voitaisiin tutkia saman kannan eri pesäkkeiden PFGE-profiileja tutkimalla tai siirrostamalla samaa kantaa useita kertoja ja tarkastamalla muuttuvatko PFGE-profiilit siirrostuksen myötä.

Y. enterocolitica biotyypin 1A ja *Y. enterocolitican* kaltaisten kantojen patogeenisuutta ja virulenssitekijöitä tulisi tutkia enemmän. Toksiinigeenin merkitystä oireiden aiheuttajana voisi tutkia kantojen toksiiniaktiivisuutta esimerkiksi soluviljelykokeiden avulla mittaamalla. Myös Myf-fibrillinia koodittavien geenien esiintyvyyttä *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kannoilla olisi mielenkiintoista tutkia, koska sen tiedetään edesauttavan bakteerin kiinnittymistä suolen soluihin ja avustavan enterotoksiinin toimintaa (Iriarte ja Cornelis, 1995). Myös uusien virulenssigeenien kartoittaminen esimerkiksi kokogenomivertailujen avulla saattaisi paljastaa mahdollisia taudinaiheuttamismekanismeja.

LÄHDELUETTELO

- Abraham, M., Pai, M., Kang, G., Asokan, G.V., Maquesh, S.R., Bhattacharji, S. & Ramakrisna, B.S.** 1997. An Outbreak of Food Poisoning in Tamil Nadu Associated with *Yersinia enterocolitica*. Indian J. Med. Res. 106:465-468.
- Aleksic, S.** 1995. Occurrence of *Y. enterocolitica* antigens O:3, O:9 and O:8 in different *Yersinia* species, their corresponding H antigens and origin. Contrib. Microbiol. Immunol. 13:89-92.
- Asplund, K., Johansson, T. & Siitonen, A.** 1998. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Genomic Restriction Fragments in the Discrimination of *Yersinia enterocolitica* O:3. Epidemiol. Infect. 121:579-586.
- Balligand, G., Laroche, Y. & Cornelis, G.** 1985. Genetic analysis of Virulence Plasmid from a Serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* Strain: Role of Outer Membrane Protein P1 in Resistance to Human Serum and Autoagglutination. Infect. Immun. 48:782-786.
- Bhagat, N. & Virdi, J.S.** 2007. Distribution of Virulence-associated Genes in *Yersinia enterocolitica* Biovar 1A Correlates with Clonal Groups and Not the Source of Isolation. FEMS Microbiol. Lett. 266:177-183.
- Biedzka-Sarek, M., Venho, R. & Skurnik, M.** 2005. Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. Infect. Immun. 73:2232-2244.
- Bisset, M.L, Powers, C., Abbott, S.L & Janda, M.** 1990. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency, and serogroup distribution. J. Clin. Microbiol. 28:910-912.
- Black, R.E., Jackson, R.J., Tsai, T., Medvesky, M., Shayeqani, M., Feeley, J.C., McLeod, K.J. & Wakelee, A.M.** 1978. Epidemic *Yersinia enterocolitica* Infection due to Contaminated Chocolate Milk. N. Engl. J. Med. 298:76-79.
- Bliska, J.B. & Falkow, S.** 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:3561-3565.
- Bottone, E.J.** 1983. Current trends of *Yersinia enterocolitica* isolates in New York City area. J. Clin. Microbiol. 17:63-67.
- Bottone, E.J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin. Microbiol. Rev. 10:257-276.
- Bresolin, G., Morgan, J.A., Igen, D., Scherer, S. & Fuchs, T.M.** 2006. Low Temperature-Induced Insecticidal Activity of *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol. 59:503-512.
- Buchrieser, C., Weagant, S.D. & Kaspar, C.W.** 1994. Molecular Characterization of *Yersinia enterocolitica* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Hybridization of DNA Fragments to *ail* and pYV Probes. Appl. Environ. Microbiol. 60:4371-4379.
- Burnens, A.P., Frey, A. & Nicolet, J.** 1996. Association between clinical presentation, biogroups and virulence attributes of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhoeal disease. Epidemiol. Infect. 116:27-34.
- Caprioli, T., Drapeau, A.J. & Kassatiya, S.** 1978. *Yersinia enterocolitica*: Serotypes and Biotypes Isolated from Humans and the Environment in Quebec, Canada. J. Clin. Microbiol. 8:7-11.
- Carniel, E., Mollaret, H.H.** 1990. Yersiniosis. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 13:51-58.

- Carniel, E., Guilvout, I & Prentice M.** 1996. Characterization of a large chromosomal “high-pathogenicity island” in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. 178:6743-6751.
- Carter, P.B.** 1975. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for Mice. Infect. Immun. 11:164-170.
- Cimolai, N., Trombley, C. & Blair, G.K.** 1994. Implications of *Yersinia enterocolitica* Biotyping. Arch. Dis. Child. 70:19-21.
- Cornelis, G.R., Sluifers, C., Delor, I., Geip, D., Kaniqa, K., Lambert de Rouvroit, C., Sory, M.P., Vanooteghem, J.C. & Michiels, T.** 1991. ymoA, a *Yersinia enterocolitica* Chromosomal Gene Modulating the Expression of Virulence Functions. Mol. Microbiol. 5:1023-1034.
- Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.B., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P. & Stainier, I.** 1998. The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1315-1352.
- Delor, I., Kaeckenbeeck, A., Wauters, G. & Cornelis, G.R.** 1990. Nucleotide Sequence of yst, the *Yersinia enterocolitica* Gene Encoding the Heat-Stable Enterotoxin, and Prevalence of the Gene among Pathogenic and Nonpathogenic Yersiniae. Infect. Immun. 58:2983-2988.
- Devenish, J.A. & Schiemann, D.A.** 1981. HeLa cell infection by *Yersinia enterocolitica*: evidence for lack of intracellular multiplication and development of a new procedure for quantitative expression of infectivity. Infect. Immun. 32:48-55.
- Dequeker, J., Jamar, R. & Walravens, M.** 1980. HLA-B27, Arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. J. Rheumatol. 7: 706-710.
- Dolina, M. & Peduzzi, R.** 1993. Population Genetics of Human, Animal, and Environmental *Yersinia* Strains. Appl. Environ. Microbiol. 59:442-450.
- Ebringer, R., Colthorpe, D., Burden, D., Hindley, C. & Ebringer, A.** 1982. *Yersinia enterocolitica* biotype I: Diarrhoea and episodes of HLA B27 related ocular and rheumatic inflammatory disease in South-East England. Scand. J. Rheumatol. 11:171-176.
- Edelman, R & Levine, M.M.** 1980. Acute diarrhoeal infections in infants. II Bacterial and Viral Causes. Hosp. Pract. 15:97-104
- Falcao, J.P., Falcao, D.P., Pitondo-Silva, A., Malaspina, A.C. & Brocchi, M.** 2006. Molecular Typing and Virulence Markers of *Yersinia enterocolitica* Strains from Human, Animal and Food Origins Isolated Between 1968 and 2000 in Brazil. J. Med. Microbiol. 55:1539-1548.
- Fearnley, C., On, S.L., Kokotovic, B., Manning, G., Cheasty, T. & Newell, D.G.** 2005. Application of Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism for Comparison of Human and Animal Isolates of *Yersinia enterocolitica*. Appl. Environ. Microbiol. 71:4960-4965.
- Filetici, E., Anastasio, M.P., Pourshaban, M. & Fantasia, M.** 2000. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Yersinia* spp. Isolates from Food and Man. Food Microbiol. 17:261-267.
- Flugel, A., Schulze-Koops, H., Heesemann, J., Kuhn, K., Sorokin, L., Burkhardt, H., von den Mark, K. & Emmrich, F.** 1994. Interaction of Enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-I and -II and nidogen/entactin. J. Biol. Chem. 269:29732-29738.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Autio, T. & Korkeala, H.** 1999. Efficient Subtyping of *Yersinia enterocolitica* Bioserotype 4/O:3 with Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Lett. Appl. Microbiol. 29:308-312.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Hallanvuoto, S., Korte, T., Siitonen, A. & Korkeala, H.** 2001a. Correspondence of Genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 Strains from Human and Porcine Sources. Epidemiol. Infect. 127:37-47.

- Fredriksson-Ahomaa, M., Korte, T. & Korkeala, H.** 2001b. Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to Pets via Contaminated Pork. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:375-378.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Niskanen, T., Bucher, M., Korte, T., Stolle, A. & Korkeala, H.** 2003. Different *Yersinia enterocolitica* 4:O3 Genotypes Found in Pig Tonsils in Southern Germany and Finland. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:132-137.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A. & Korkeala, H.** 2006. Molecular Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* Infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47:315-329.
- Gemski, P., Lazere, J.R. & Casey, T.** 1980. Plasmid Associated with Pathogenity and Calcium Dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 27(2):682-685.
- Gierczyński, R., Golubov, A., Neubauer, H., Pham, J.N. & Rakin, A.** 2007. Development of Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) for *Yersinia enterocolitica paleartica* and its Application to Bioserogroup 4/O3 Subtyping. *J. Clin. Microbiol.* Jun 6
- Grant, T., Bennet-Wood, V. & Robins-Browne, R.M.** 1998. Identification of Virulence-Associated Characteristics in Clinical Isolates of *Yersinia enterocolitica* Lacking Classical Virulence Markers. *Infect. Immun.* 66:1113-1120.
- Grant, T., Bennet-Wood, V & Robins-Browne, R.M.** 1999. Characterization of the Interaction between *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A and Phagocytes and Epithelial Cells In Vitro. *Infect. Immun.* 67:4367-4375.
- Greenwood, M.H. & Hooper W.L.** 1990. Excretion of *Yersinia* spp. Associated with Consumption of Pasteurized Milk. *Epidemiol. Infect.* 104:345-350.
- Guiyole, A., Gerimont, F., Itean, I., Grimont, P.A., Lefèvre, M & Carniel, E.** 1994. Plague Pandemics Investigated by Ribotyping of *Yersinia pestis* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 32:634-641.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hallanvuoto, S., Peltola, J., Heiskanen, T. & Siitonen, A.** 2006. Simplified Phenotypic Scheme Evaluated by 16S rRNA Sequencing for Differentiation between *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica* -Like species. *J. Clin. Microbiol.* 44:1077-1080.
- Hatakka, M., Johansson, T., Kuusi, M., Maijala, R., Pakkala, P. & Siitonen, A.** 2004. Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2003. *Elintarvikeviraston julkaisuja.* 7/2004
- Huang, X., Yoshino, K., Nakao, H. & Takeda, T.** 1997. Nucleotide Sequence of a Gene Encoding the Novel *Yersinia enterocolitica* Heat-Stabile Enterotoxin that Includes a Pro-region-Like Sequence in its Mature Toxin Molecule. *Microb. Pathog.* 22:89-97.
- Hänninen, M.L. & Raevuori, M.** 1981. Occurance of *Cambylobacter fetus* subsp. *jejuni* and *Yersinia enterocolitica* in domestic animal and in some foods of animal origin in Finland. *Nord. Vet. Med.* 33:441-445.
- Howard, S.L., Gaunt, M.L., Hinds, J., Witney, A.A., Stabler, R & Wren, B.W.** 2006. Application of Comparative Phylogenomics To Study the Evolution of *Yersinia enterocolitica* and to Identify Genetic Differences Relating to Pathogenicity. *J. Bacteriol.* 188:3645-3653.
- Huovinen, E., Kuusi, M., Sihvonen, L., Haukka, K. & Siitonen, A.** 2006. Yersiniainfektiot Suomessa 1995-2005. *Suomen lääkirilehti* 46:4813-4818.
- Ibrahim, A., Liesack, W., Griffiths, M.W. & Robins-Browne, R.M.** 1997. Development of a Highly Specific Assay for rapid Identification of Pathogenic Strains of *Yersinia enterocolitica* Based on PCR Amplification of the *Yersinia* heat-Stabile Enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 35:1636-1638.

- Iriarte, M., Vanooteqhem, J.C., Delor, I., Diaz, R., Knutton, S. & Cornelis, G.R.** 1993. The Myf Fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 9:507-520.
- Iriarte, M. & Cornelis, G.R.** 1995. MyfF, an Element of the Network Regulating the Synthesis of Fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 177:738-744.
- Isberg, R.R. & Leong, J.M.** 1990. Multiple beta 1 chain integins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 60:861-871.
- Iteman, I., Guiyoule, A. & Carniel, E.** 1996. Comparison of Three Molecular Methods for Typing and Subtyping Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains. *J. Med. Microbiol.* 45:48-56.
- Kandolo, K. & Wauters G.** 1985. Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. *J. Clin. Microbiol.* 21:980-982.
- Kapperud, G.** 1982. Enterotoxin Production at 4 degrees, 22 degrees, 37 degrees C and *Y. enterocolitica*-Like bacteria. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 90:185-189.
- Kapperud, G.** 1991. *Yersinia enterocolitica* in Food Hygiene. *Int. J. Food Microbiol.* 12:53-66.
- Kemper, N., Aschfalk, A. & Höller, C.** 2006. *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., and *Cryptosporidium* oocysts in semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Northern Finland and Norway. *Acta. Vet. Scand.* 48:7.
- de Koning-Ward, T.F. & Robins-Browne, R.M.** 1995. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 63:3790-3795.
- Kuehni-Boghenbor, K., On, S.L., Kokotovic, B., Baumgartner, A., Vassenaar, T.M., Wittwer, M., Bissing-Choisat, B. & Frey, J.** 2006. Genotyping of Human and Porcine *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia intermedia* and *Yersinia bercovierii* Strains from Switzerland by Amplified Fragment Length Polymorphism Length Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4061-4066.
- Kwaga, J., Iversen, J.O. & Misra, V.** 1992. Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by Polymerase Chain Reaction and Digoxigenin-Labelled Polynucleotide Probes. *J. Clin. Microbiol.* 30:2668-2673.
- Linde, H.J., Neubauer, H., Meyer, H., Stojanca, A. & Norbert L.** 1999. Identification of *Yersinia* Species by the Vitek GNI Card. *J. Clin. Microbiol.* 37:211-4.
- Loftus, C.G., Harewood, G.C., Cockerill III, F.R. & Murray, J.A.** 2002. Clinical Features of Patients with Novel *Yersinia* Species. *Diq. Dis. Sci.* 47:2805-2810.
- McNally, A., Dalton, T., La Ragione, R.M., Stapleton, K., Manning, G. & Newell, D.G.** 2006. *Yersinia enterocolitica* Isolates of Different Biotypes from Humans and Animals are Adherent, Invasive and Persist in Macrophages, but Differ in Cytokine Secretion Profiles *in vitro*. *J. Med. Microbiol.* 55:1725-1734.
- Mikulskis, A.V., Delor, I., Thi, V.H. & Cornelis, G.R.** 1994. Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of Growth Phase, Temperature, Osmolarity, pH and Bacterial Host Factors. *Mol. Microbiol.* 14:905-915.
- Miller, V.L & Falcow, S.** 1988. Evidence for two Genetic Loci in *Yersinia enterocolitica* That Can Promote Invasion of Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 56:1242-1248.
- Miller, V.L., Farmer III, J.J., Hill, W.E. & Falkow, S.** 1989. The *ail* Locus is Found Uniquely in *Yersinia enterocolitica* Serotypes Commonly Associated with Disease. *Infect. Immun.* 56:121-131.
- Morris, J.G. Jr, Prado, V., Ferreccio, C., Robins-Browne, R.M., Bordun, A., Cayazzo, M, Kay, B.A. & Levine, M.M.** 1991. *Yersinia enterocolitica* Isolated from Two Cohorts of Young Children in Santiago, Chile: Incidence of and Lack of Correlation between Illness and Proposed Virulence Factors. *J. Clin. Microbiol.* 29:2784-2788.

- Nair, G.B & Takeda, Y.** 1998. The Heat-Stabile Enterotoxins. *Microb. Pathog.* 24:123-131.
- Najdenski, H., Iteman, I. & Carniel, E.** 1994. Efficient Subtyping of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 32:2913-2920.
- Neubauer, H., Sauer, T., Becker, H., Stojanca, A. & Meyer, H.** 1998. Comparison of Systems for Identification and Differentiation of Species within the Genus *Yersinia*. *J. Clin. Microbiol.* 36:3366-8.
- Neubauer, H., Hansel, A., Aleksic, S & Meyer, H.** 2000. Identification of *Yersinia enterocolitica* with in Genus *Yersinia*. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:56-62.
- Noble, M.A., Barteluk, R.L., Freeman, H.J, Subramaniam, R. & Hudson, J.B.** 1987. Clinical Significance of Virulence-Related Assay of *Yersinia* Species. *J. Clin. Microbiol.* 25:802-807.
- van Noyen, R., Vandepitte, J. & Wauters, G.** 1980. Nonvalue of cold enrichment of stools for isolation of *Yersinia enterocolitica* serotypes 3 and 9 from patients. *J. Clin. Microbiol.* 11:127-131.
- Niskanen, T., Hatakka, M & Korkeala, H.** 2001. *Yersinia pseudotuberculosis* esiintyminen ahvenanmaalaisessa jäävuorisalaatissa, maaperässä ja vedessä. *Elintarvikeviraston julkaisuja.* 5/2001.
- Okamoto, K., Inoue, T., Ichikawa, H., Kawamoto, Y & Miyama, A.** 1981. Partial Purification and Characterization of Heat-Stabile Enterotoxin Produced by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 31:544-549.
- Pai, C.H. & Mors, V.** 1978. Production of Enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 19:908-911.
- Pai, C.H. & DeStephano, L.** 1982. Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35:605-611.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebahia, M, James, K.D., Churcher, C, Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. & Barrell, B.G.** 2001. Genome Sequence of *Yersinia pestis*, the Causative Agent of Plague. *Nature.* 413:523-527.
- Pepe, J.C. & Miller, V.L.** 1993. *Yersinia enterocolitica* invasion: A primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6473-7.
- Pepe, J.C., Badger, J.L. & Miller, V.L.** 1994. Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. *Mol. Microbiol.* 11:123-135.
- Pierson, D.E. & Falkow, S.** 1990. Nonpathogenic Isolates of *Yersinia enterocolitica* Do Not Contain Functional *inv*-Homologous Sequences. *Infect. Immun.* 58:1059-1064.
- Pilon, J., Higgins, R. & Quessy, S.** 2000. Epidemiological Study of *Yersinia enterocolitica* in Swine Herds in Quebec. *Can. Vet. J.* 41:383-387
- Pilz, D., Vocke, T., Heesemann, J. & Brade, V.** 1992. Mechanism of YadA-Mediated Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O3. *Infect. Immun.* 60:189-195.
- Prpic, J.K., Robins-Browne, R.M. & Davey, R.B.** 1983. Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using Congo red agar. *J. Clin. Microbiol.* 18:486-490
- Ramamurthy, T., Yoshino, K., Huang, X., Balakrish Nair, G., Carniel, C. Maruyama, T., Fukushima, H. & Takeda, T.** 1997. The novel heat-stabile enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *Microb. Pathog.* 23:189-200.

- Ratnam, S., Mercer, E., Picco, B., Parsosn, S. & Butler, R.** 1982. A Nosocomial Outbreak of Diarrheal Disease due to *Yersinia enterocolitica* Serotype O:5, Biotype 1. *J. Infect. Dis.* 145:242-247.
- Riley, G. & Toma, S.** 1989. Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by Using Congo Red-Magnesium-Oxalate Agar Medium. *J. Clin. Microbiol.* 27:213-214.
- Robins-Browne, R.M., Still, C.S., Miliotis, M.D. & Koornhof, H.J.** 1979. Mechanism of Action of *Yersinia enterocolitica* Enterotoxin. *Infect. Immun.* 25:680-684.
- Robins-Browne, R.M., Miliotis, M.D., Cianciosi, S., Miller, V.L., Falcow, S & Morris, G.R. Jr.** 1989. Evaluation of DNA Colony Hybridization and Other Techniques for Detection of Virulence in *Yersinia* Species. *J. Clin. Microbiol.* 27:644-650.
- Roggenkamp, A., Bittner, T., Leitritz, L., Sing, A. & Heesemann, J.** 1997. Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Infect. Immun.* 65:4705-4710.
- Rüssmann, H., Ruckdeschel, K. & Heesemann, J.** 1996. Translocation of *Yersinia enterocolitica* through an Endothelial MONolayer by Polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 64:1016-1019.
- Sachdeva, p. & Viridi, J.S.** 2004. Repetitive Elements Sequence (REP/ERIC)-PCR Based Genotyping of Clinical and Environmental Strains of *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A Reveal Existence of Limited Number of Clonal Groups. *FEMS Microbiol. Lett.* 240:193-201.
- Saken, E., Roggenkamp, A., Aleksic, S. & Heesemann, J.** 1994. Characterization of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Serogroups by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Genomic *NotI* Restriction Fragments. *J. Med. Microbiol.* 41:329-338.
- Schiemann, D.C.** 1979. Synthesis of a Selective Agar Medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.* 25:1298-1304.
- Schiemann, D.C. & Davenish, J.A.** 1982. Relationship of HeLa cell Infectivity to Biochemical, Serological and Virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35:497-506.
- Singh, I. & Viridi, J.S.** 2004. Production of *Yersinia* Stable Toxin (YST) and Distribution of *yst* Genes in Biotype 1A Strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Med. Microbiol.* 53:1065-1068.
- Skurnik, M.** 1985. Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. *Infect. Immun.* 47:183-190.
- Sulakvelidze, A., Kreger, A., Joseph, A., Robins-Browne, R.M., Fasano, A., Wauters, G., Harnett, N., DeTolla, L. & Morris, J.G.** 1999. Production of Enterotoxin by *Yersinia bercovieri*, a Recently Identified *Yersinia enterocolitica*-Like Species. *Infect. Immun.* 67:968-971.
- Sulakvelidze, A.** 2000. *Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes Infect.* 2:497-513.
- Takao, T., Tominaga, N., Yoshimura, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Inoue, T & Miyama, A.** 1985. Isolation, primary structure and synthesis of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Eur. J. Biochem.* 152:199-206.
- Tennant, S.M., Grant, T.H. & Robins-Browne, R.M.** 2003. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38:127-137.
- Tennant, S.M., Skinner, N.A., Joe, A. & Robins-Browne, R.M.** 2005. Homologues of Insecticidal Toxin Complex Genes in *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A and Their Contribution to Virulence. *Infect. Immun.* 73:6860-6867.

- Thisted Lambertz, S. & Danielsson-Tham, ML.** 2005. Identification and Characterization of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Isolates by PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3674-81.
- Tuori, M.R & Valtonen, V.** 1983. *Yersinia enterocolitica* outpatient epidemic. *Duodecim.* 99:706-711.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. et al.** 1995. AFPL: a New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Wachter, E. & Brade, V.** 1989. Influence of Surface Modulations by Enzymes and Monoclonal Antibodies on Alternative Complement Pathway Activation by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 57:1984-1989.
- Wauters, G., Kandolo, K. & Janssens, N.** 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9:14-21.
- Wojciech, L., Staroniewicz, Z., Jakubczak, A. & Ugorski, M.** 2004. Typing of *Yersinia enterocolitica* Isolates by ITS profiling, REP- and ERIC-PCR. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 51:238-244.
- Yoshino, K., Huang, X., Miyachi, M., Hong, Y., Takao, T., Nakao, H., Tadeka, T. & Shimonshi, Y.** 1994. Amino Acid Sequence of a Novel Heat-Stable Enterotoxin produced by a *yst* Gene-Negative strain of *Yersinia enterocolitica*. *Lett. Pept. Sci.* 1:95-105.
- Yoshino, K., Takao, T., Huang, X., Murata, H., Nakao, H., Tadeka, T. & Shimonshi, Y.** 1995. Characterization of a Highly Toxic, Large Molecular Size Heat-Stable Enterotoxin Produced by a Clinical Isolate of *Yersinia enterocolitica*. *FEBS Lett.* 363:319-322.
- Young, V.B., Miller, V.L., Falcow, S. & Schoolnik, G.K.** 1990. Sequence, Localization and Function of Invasin Protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 4:1119-1128.
- Young, V.B., Falcow, S & Schoolnik, G.K.** 1992. The Invasin Protein of *Yersinia enterocolitica*: Internalization of Invasin Bearing Bacteria by Eukaryotic Cells Is Associated with Reorganization of the Cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 116:197-207
- Zink, D.L., Feeley, J.C., Wells, J.G., Vanderzant, C. Vickery, J.C. & O'Donovan, A.** 1980. Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. *Nature.* 283:224-225.

LIITE Kasvatusalustat ja reagenssit

(Lähde: KTL, Laboratoriotyön tukipalveluyksikkö)

R1-agari

| | | |
|-------------------------|-------------|---------|
| Lab-lemco powder | OXOID | 2,4 g |
| Bacteriological peptone | OXOID | 10,0 g |
| Yeast extract | BD | 4,5 g |
| NaCl | YO APTEEKKI | 5,0 g |
| Agar | YO APTEEKKI | 10,0 g |
| Purified water | | 1000 ml |

säädetään pH 7,5; autoklavoidaan 121 °C, 20 minuuttia

CBS-putki

| | |
|----------|--------|
| Tris-HCl | 100 mM |
| EDTA | 100 mM |

pH 8.0

Lyysis-puskuri

| | |
|---------------------|-------|
| EDTA | 50 mM |
| N-layroyl-sarcosine | 1 % |
| Tris-HCl | 50 mM |

pH 8.0; steriilisuodatetaan

TE-puskuri

| | |
|----------|-------|
| Tris-HCl | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

5 x TBE

| | | |
|-----------------|-------|---------|
| Boric acid | MERCK | 27,50 g |
| Tris ultra pure | ICN | 54,00 g |
| Titriplex III | MERCK | 3,72 g |
| Purified water | | 1000 ml |

pH 8.3; autoklavoidaan 121 °C 20 minuuttia

Drigalski-Conrad –agariAgari:

| | | |
|-------------------------|-------------|---------|
| Lab-lemco powder | OXOID | 2,4 g |
| Bacteriological peptone | OXOID | 10,0 g |
| Yeast extract | BD | 4,5 g |
| NaCl | YO APTEEKKI | 5,0 g |
| Agar | YO APYEEKKI | 10,0 g |
| Purified water | | 1000 ml |

säädetään pH 7.5; autoklavoidaan 121 °C, 20 minuuttia

Laktoosi:

| | | |
|-------------------|-------------|---------|
| Lactos. Monohydr. | YO APTEEKKI | 330,0 g |
| Purified water | | 1000 ml |

autiklavoidaan 115 °C, 15 minuuttia

Bromikresolipurppura 1,6 %

| | | |
|------------------------|-------|--------|
| Bromkresol purple | MERCK | 16,0 g |
| Etanoli, 96 % | | 600 ml |
| Sterile purified water | | 400 ml |

valmistetaan aseptisesti

Yhdistäminen ennen majojen valua:

| | | |
|---------------------------------|--|---------|
| Agari | | 1000 ml |
| Laktoosi-liuos 33 % | | 30 ml |
| Bromikresolipurppuraliuos 1,6 % | | 1,9 ml |